

Universidad de Cádiz



“Biosensores basados en cisteína y análogos. Aplicaciones en la detección de metales pesados en fluidos biológicos”

Máster en Química Médica

Curso 2019-2020

Autor:

Julio Ricardo Rodríguez Izquierdo

Tutores:

Prof. Dr. Laura Cubillana Aguilera

Prof. Dr. José María Palacios Santander

**BIOSENSORES BASADOS EN CISTEÍNA Y ANÁLOGOS.
APLICACIONES EN LA DETECCIÓN DE METALES
PESADOS EN FLUIDOS BIOLÓGICOS**

TRABAJO FIN DE MÁSTER

realizado en la

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CÁDIZ

Memoria del Trabajo Fin de Máster presentada por el alumno D. Julio Ricardo Rodríguez Izquierdo, para optar al título de Máster en Química Médica

Puerto Real, a 14 de julio de 2020



Fdo. Julio Ricardo Rodríguez Izquierdo

D^a. LAURA CUBILLANA AGUILERA y D. JOSÉ MARÍA PALACIOS

SANTANDER, ambos Profesores Titulares de Universidad pertenecientes al
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA de la UNIVERSIDAD DE CÁDIZ,

HACEN CONSTAR:

Que el Trabajo de Fin de Máster titulado “BIOSENSORES BASADOS EN CISTEÍNA Y ANÁLOGOS. APLICACIONES EN LA DETECCIÓN DE METALES PESADOS EN FLUIDOS BIOLÓGICOS”, constituye la memoria que presenta D. JULIO RICARDO RODRÍGUEZ IZQUIERDO, para aspirar al título de Máster en Química Médica y ha sido realizado íntegramente en los laboratorios del Departamento de Química Analítica de esta Universidad, bajo nuestra tutela. Ha sido supervisada por nosotros y consideramos que reúne los requisitos para optar al título de MÁSTER EN QUÍMICA MÉDICA.

Y para que así conste, expedimos y firmamos el presente informe en Puerto Real, Cádiz, a catorce de julio de dos mil veinte.



Fdo: Laura Cubillana Aguilera



Fdo: José María Palacios Santander

D^a. MARÍA DOLORES GALINDO RIAÑO, CATEDRÁTICA DE UNIVERSIDAD Y DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA DE LA UNIVERSIDAD DE CÁDIZ

HACE CONSTAR:

Que el Trabajo de Fin de Máster titulado "BIOSENSORES BASADOS EN CISTEÍNA Y ANÁLOGOS. APLICACIONES EN LA DETECCIÓN DE METALES PESADOS EN FLUIDOS BIOLÓGICOS", constituye la memoria que presenta D. JULIO RICARDO RODRÍGUEZ IZQUIERDO, para aspirar al título de Máster en Química Médica y ha sido realizado íntegramente en los laboratorios del Departamento de Química Analítica de esta Universidad, bajo la tutela de los profesores Dr. José María Palacios Santander y Dra. Laura Cubillana Aguilera.

Y para que así conste, expido y firmo el presente informe en Puerto Real, Cádiz, a catorce de julio de dos mil veinte.

Fdo: María Dolores Galindo Riaño



DEPARTAMENTO DE
QUÍMICA ANALÍTICA

Código Seguro de verificación: SJzrn3SxGaIm/jcqmq0/+g==. Permite la verificación de la integridad de una copia de este documento electrónico en la dirección: https://verificarfirma.uca.es Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la Ley 59/2003, de 19 de diciembre, de firma electrónica.			
FIRMADO POR	MARIA DOLORES GALINDO RIAÑO	FECHA	14/07/2020
ID. FIRMA	angus.uca.es	PÁGINA	1/1
SJzrn3SxGaIm/jcqmq0/+g==			

*En esta ocasión va por mi abuelo.
Hallaremos el camino, y si no haremos uno*

A mi enorme familia, por su voluntad capaz de cruzar 7120,09 km de Océano Atlántico para darme ánimo y soñar conmigo. Gracias por la confianza depositada y todo lo positivo sembrado en mí. Aunque estén lejos cada pequeño triunfo sería imposible sin ellos.

A Ivis por su apoyo incondicional y a Pedro, por sus buenos consejos y ayudarme a ver lo oportuno de cada situación aun cuando carezca de sentido. A Ivyliet, con quien desde hace cuatro años comparto sueños, proyectos y aspiraciones. Gracias por estar a mi lado cada minuto y no rendirme nunca.

A mis amigos, quienes poco a poco e irreversiblemente se vuelven cada día mi familia.

Finalmente y no con menos importancia, a mis tutores, quienes han sabido afrontar conmigo las “nuevas circunstancias” y plantarles cara. Sin su ayuda, guía y dedicación sería imposible la culminación de este trabajo.

Índice

• Resumen.....	1
• Abstract.....	2
• Capítulo 1: Introducción.....	3
• 1.1-Descripción general y ciclo del mercurio.....	4
• 1.2-Formas del mercurio y su toxicidad:	6
• 1.2.1-Estado elemental (Hg^0)	6
• 1.2.2-Mercurio inorgánico (Hg^+ y Hg^{2+}).....	6
• 1.2.3-Mercurio orgánico.....	7
• 1.3-Mecanismos de movilidad celular. Efecto neurotóxico del MeHg.....	8
• 1.4-Detección de Hg. Posibles estrategias y propuesta.....	9
• Objetivos	11
• Materiales y Métodos.....	12
• Capítulo 2: Biosensores y generalidades.....	14
• 2.1-Biosensores según el tipo de transductor:	14
• 2.1.1-Electroquímicos:	14
• 2.1.2-Ópticos:.....	15
• 2.1.3-Piezoelectrónicos:.....	15
• 2.1.4-Termométricos:.....	15
• 2.1.5-Nanomecánicos:	15
• 2.2-Biosensores según el tipo de receptor biológico.	16
• 2.2.1-Biosensores catalíticos:.....	16
• 2.2.2-Biosensores de afinidad:.....	17
• 2.2.3-Receptores ricos en cisteína.	17
• Capítulo 3. Biosensores electroquímicos para la detección de mercurio.	19
• 3.1-Biosensores electroquímicos basados en cisteína.....	20
• 3.1.1-Detección amperométrica de Hg empleando enzima ureasa como bioreceptor.	20
• 3.1.2-Detección de mercurio mediante electrodos de óxido de grafeno recubiertos con cisteína.....	20
• 3.1.3-Detección de Hg con biosensor electroquímico basado en metalotioenina.....	21
• 3.2-Biosensores electroquímicos basados en AuNPs para la detección de Hg.....	22
• Capítulo 4: Biosensores ópticos para la detección de Hg.	26

• 4.1-Biosensores Ópticos. Generalidades.....	26
• 4.2-Fenómenos físicos en los que se basan los biosensores ópticos.	26
• 4.2.1-Sensores de luminiscencia:.....	26
• 4.2.2-Sensor de absorbancia:	27
• 4.2.3-Sensor de índice de refracción:.....	27
• 4.2.4-Sensor de dispersión de la luz:.....	28
• 4.2.5-Resonancia plasmónica superficial:	28
• 4.3-Biosensores óptico-colorimétricos para la detección de Hg basados en cisteína y nanopartículas de oro.	29
• 4.3.1 Biosensor de absorción basado en AuNPs funcionalizadas con L-cisteína y compuestos similares.	31
• 4.3.2-Biosensor para determinación de Hg basado en antiagregación de AuNPs funcionalizadas con L-cisteína y compuestos similares.	32
• 4.3.3- Biosensor fluorescente basado en AuNPs recubiertas con cisteína.....	33
• Capítulo 5: Propuesta de biosensor para la detección de Hg.....	36
• Conclusiones	42
• Bibliografía	43

Resumen

El mercurio, como la mayoría de los metales pesados, es conocido por su toxicidad. Afecta fundamentalmente a los riñones y al cerebro, causando serios daños neurológicos. Debido a su alta capacidad de biomagnificación y al incremento de su emisión antropogénica, es necesario contar con sensores que faciliten su detección. Los biosensores se muestran como una alternativa a tener en cuenta gracias a su buena selectividad y sensibilidad.

En este trabajo se comentan los tipos de biosensores que existen y sus características principales, y se lleva a cabo una revisión bibliográfica sobre biosensores de mercurio basados en nanopartículas de oro (AuNPs). Dentro de estos, los principales biosensores electroquímicos y ópticos diseñados para la detección de mercurio serán estudiados, específicamente aquellos en los que las AuNPs se funcionalizan con L-cisteína (Cys) o compuestos análogos. También se comentarán críticamente las ventajas y desventajas de los biosensores de este tipo existentes hasta la fecha, prestando especial interés a la complejidad del sistema biosensor, el proceso de detección del mercurio (electroquímico, óptico-colorimétrico, óptico-de otra índole), así como el rendimiento del biosensor en base a sus parámetros analíticos de calidad y su posible aplicabilidad, tanto en muestras de agua como en fluidos biológicos. Finalmente, se hará una propuesta de biosensor basado en ácido dimercaptosuccínico y L-cisteína para la detección de mercurio en dichos fluidos.

Abstract

Mercury, like most heavy metals, is known for its toxicity. It mainly affects the kidneys and the brain causing serious neurological damage. Due to its high bio magnification capacity and the increase in its anthropogenic emission, it is necessary to have sensors that facilitate its detection. Biosensors are shown as an alternative to consider due to their good selectivity and sensitivity.

In this work, the types of biosensors that exist and their main characteristics are discussed. A literature review on gold nanoparticles-based mercury biosensors (AuNPs) is conducted. Within these, the main electrochemical and optical biosensors designed for the detection of mercury will be studied, specifically those in which the AuNPs are functionalized with L-cysteine (Cys) or analogous compounds. The advantages and disadvantages of biosensors of this type existing to date will be critically discussed, with special emphasis on the complexity of the biosensor system, the mercury detection process (electrochemical, optical-colorimetric, optical-other), as well as the performance of the biosensor based on its analytical quality parameters and its possible applicability, both in water samples and in biological fluids. Finally, a proposal will be made for a biosensor based on dimercaptosuccinic acid and L-cysteine for the detection of mercury in these fluids.

Capítulo 1: Introducción.

Según la Organización Mundial de la Salud el mercurio se considera dentro de los diez primeros compuestos de naturaleza química de mayor preocupación para la salud pública a nivel mundial¹. El 6 de febrero de 2006 se dio lugar en Dubái a la primera Conferencia Internacional sobre Gestión de los Productos Químicos. En ella se diseñó lo que se conoce como Enfoque Estratégico para la Gestión de Productos Químicos a nivel Internacional.

En dicha estrategia se buscaba lograr que los productos químicos se generen y empleen de modo que se minimicen los efectos perniciosos que puedan tener en la salud del ser humano y el medio ambiente. Precisamente el mercurio (Hg) posee un papel destacado en ella tras su creciente emisión antropogénica y las consecuencias de la misma². El 16 de agosto de 2017 se ha ratificado y aprobado lo que se conoce como Convenio de Minamata. Este es el primer acuerdo ambiental mundial negociado en el siglo XXI. El mismo constituye un instrumento jurídicamente vinculante, y mediante él, los países participantes se comprometen a un continuo seguimiento de las emisiones de Hg, regulación de su ciclo global y hacer una transición tecnológica hacia un desarrollo industrial sin el empleo del Hg y que no provoque su liberación al medio ambiente³.

En la lista de prioridad de sustancias tóxicas de la Agencia de Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades de los Estados Unidos de América, el Hg ocupa la tercera posición debido a su peligrosidad⁴. No obstante, no siempre se ha considerado peligroso debido al desconocimiento de sus efectos dañinos para la salud del ser humano. A pesar de que se emite naturalmente a la atmósfera, producto de fuegos forestales y la actividad volcánica, el desarrollo industrial ha exacerbado las cantidades del mismo. Principalmente actividades como la industria minera o la quema de carbón como combustible son las causantes de este incremento.

Múltiples han sido las aplicaciones que se le han dado al Hg a lo largo de la historia. Se ha utilizado en la confección de termómetros, manómetros, en la fabricación de baterías, en las lámparas de los faros, como terapia contra la sífilis, en amalgamas dentales y en el conocido proceso cloro-álcali para generar cloro e hidróxido de sodio a partir de NaCl. Esta última continúa siendo la mayor aplicación del Hg en el siglo XX. El Hg, igualmente, jugó un rol esencial en el proceso de amalgamación y destilación para la extracción de oro y plata en la industria minera. Por su capacidad para formar amalgamas con estos metales se facilita la extracción de los mismos. Posteriormente, se sometía la aleación de Hg/Au o Hg/Ag a calentamiento que permitiera la volatilización del Hg para obtener el oro y plata de las minas. Se estima que la mitad del Hg producido en la historia de la humanidad se empleó en minería de este tipo. Hoy en día, la mayor parte de la contaminación por mercurio de los peces de lugares como la Bahía de San Francisco o el Río Sacramento se atribuye a la actividad minera del siglo XIX⁵. Este es un ejemplo de como el desconocimiento sobre el ciclo de vida de este metal y la repercusión de su emisión a la atmósfera tiene consecuencias en la actualidad. A partir del

año 1960 se ha proscrito esta variante de minería; no obstante las consecuencias de la negligencia de incluso siglos pasados aún se encuentran vigentes.

En la década de 1950 el mundo fue testigo de un evento de contaminación masiva por metilmercurio en la Bahía de Minamata, en Japón. El consumo de pescado con alto contenido en dicho compuesto originó lo que se conoce como la enfermedad de Minamata. Alteraciones sensoriales, reducción del campo visual, trastornos de coordinación, disartria, alteración auditiva y temblor son algunos de los síntomas presentados por los afectados por la enfermedad. La intoxicación transplacentaria del feto es uno de los aspectos más terribles, generando lo que se conoce como Enfermedad de Minamata Congénita. En ella se observa retraso mental, reflejos primitivos, trastornos de coordinación, disartria, deformación de las extremidades, trastorno de crecimiento, corea y movimientos atetósicos e hipersalivación⁶. De igual forma, en Iraq, en la década de 1970, se dio un suceso similar, pero por contaminación a través de pan elaborado con trigo proveniente de semillas contaminadas con Hg.

Hoy en día existe un creciente conocimiento y toma de consciencia de la necesidad de monitorizar la emisión de mercurio al medio ambiente. A su vez, es de vital importancia conocer las vías por las que puede llegar a generar la contaminación y dañar la salud de los seres vivos. Es por ello que la búsqueda constante de nuevos sensores que permitan detectar las más bajas concentraciones de este metal de una forma selectiva, sensible, portátil y sencilla se muestra como un reto de vital importancia.

1.1-Descripción general y ciclo del mercurio.

El mercurio es un elemento metálico encontrado en la naturaleza, que existe fundamentalmente de tres formas, como mercurio elemental, formando compuestos inorgánicos y en compuestos orgánicos. Es conocido por su alta toxicidad para la salud del ser humano y otros seres vivos. Es un metal pesado, de número atómico 80, con un punto de fusión de $-38,4^{\circ}\text{C}$ y punto de ebullición de 357°C . En función de la forma en que se encuentre puede presentar estado de oxidación 0, +1 o +2. Es líquido a temperatura ambiente y por su alta tensión superficial es capaz de formar amalgamas con facilidad con otros metales.

En cuanto a su abundancia en la corteza terrestre es el elemento número 67°. Se encuentra en estado libre, en pequeñas cantidades, oculto en grandes masas rocosas y combinado con la plata, pero la mayor parte existe como mineral en el cinabrio (HgS). El cinabrio tiene una composición de un 86,21% de mercurio y un 13,79% de azufre⁷. Precisamente en España se encuentra el yacimiento de cinabrio más grande del mundo, más concretamente en Almadén, de donde se estima que se ha extraído la tercera parte de todo el mercurio empleado por la humanidad⁸. Las principales formas de emisión del mercurio al medio ambiente pueden dividirse en naturales o antropogénicas. Las formas de emisión naturales se relacionan con: la actividad volcánica, la emisión en estado gaseoso por la actividad geotérmica, los terremotos, a partir de aguas termales, la erosión de los suelos y la

volatilización del ambiente marino. Las vías de emisión antropogénica son, fundamentalmente, la minería, actividad industrial que emplee Hg, la quema de combustibles fósiles, la industria del cemento y los desechos de instalaciones médicas⁹. El ciclo global del mercurio (ver Figura 1) ha sido descrito según los siguientes puntos¹⁰:

1. Desgasificación a partir de rocas, suelos, aguas superficiales, actividad volcánica o actividad antropogénica.
2. Movimiento en forma gaseosa a través de la atmósfera.
3. Deposición en tierra y aguas superficiales.
4. Conversión a sulfuro de mercurio.
5. Precipitación o biotransformación en formas más solubles o volátiles como el metilmercurio.
6. Reentrada en la atmósfera o bioacumulación en la cadena alimenticia.

Las emisiones de Hg pueden clasificarse en emisiones primarias y emisiones secundarias. En las emisiones primarias, el mercurio se encuentra en sus reservorios naturales en la litosfera y se desplaza a la atmósfera. Esto puede estar inducido por causas naturales o por acción antropogénica. Una vez en la atmósfera sigue el ciclo presentado en la Figura 1.

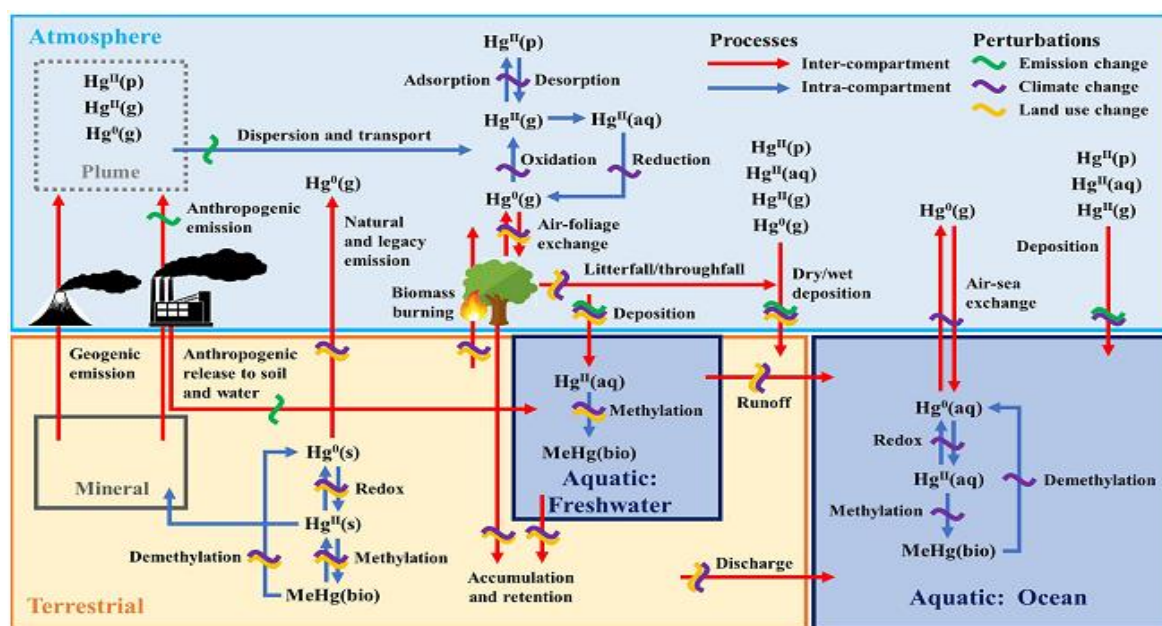


Figura 1: Ciclo del Hg según Ref⁹

En dicho ciclo el proceso relacionado con la reemisión a la atmósfera o bioacumulación, se considera una fuente secundaria de emisión. La emisión primaria de mercurio incrementa su nivel en los reservorios superficiales; la emisión secundaria o reemisión, varía la distribución del mercurio a nivel global¹¹. El mercurio elemental (Hg^0) puede presentar un período de residencia en la atmósfera de hasta un año. Dicho factor lo convierte en la especie del metal responsable de su movimiento a distintas regiones a nivel global. Para el caso del mercurio iónico (Hg^{2+} , principalmente), su tiempo de

residencia en la atmósfera es menor. Esto provoca que se deposite a nivel regional. Por esta vía es como comúnmente se asimila e introduce en los diversos ecosistemas. Por otro lado, en la forma orgánica más común, metilmercurio (o MeHg), es en la que más se bio-produce una vez dentro del ecosistema¹¹.

1.2-Formas del mercurio y su toxicidad:

En función de la especie de mercurio que propicie la contaminación en una persona, se conocen diversos efectos negativos, como pueden ser, daño neurodegenerativo, daño a los riñones, daño cardiovascular, enfermedades autoinmunes, daño del sistema endocrino y disfunción muscular. A continuación se realiza una descripción detallada de cada especie de Hg, haciéndose énfasis en el MeHg por ser la forma en la que mayor tiempo puede estar en el organismo humano y dañarlo.

1.2.1-Estado elemental (Hg^0)

Rara vez se encuentra libre; no obstante, se puede generar debido al calentamiento de cinabrio. En este estado puede volatilizarse lentamente debido a su alta presión de vapor¹², siendo un gas incoloro e inodoro. En forma de vapor, una vez inhalado, es absorbido por el tracto respiratorio. De llegar al torrente sanguíneo, es oxidado por los glóbulos rojos de la sangre, en presencia de catalasas y peroxidasas, a su forma de Hg^+ o a Hg^{2+} . El mercurio elemental es lipofílico, lo que le permite difundirse a través de las membranas celulares, la barrera hematoencefálica y la barrera placentaria, forma en la que puede actuar sobre estas zonas del organismo¹³. También se pueden manifestar síntomas como escozor en la piel, pérdida de memoria o problemas en la capacidad cognitiva y fallo en los riñones. De producirse inhalación de vapores de mercurio concentrados se puede distribuir rápidamente por el organismo afectando directamente al sistema nervioso central y la placenta¹⁴. Entre las formas más comunes de intoxicación se pueden destacar: inhalación de vapores de termómetros rotos, uso de amalgamas dentales o exposición a zonas de actividad minera del metal¹⁵. El Hg^0 , una vez en el aire, puede oxidarse a Hg^+ o a Hg^{2+} y, luego depositarse en suelos y aguas superficiales a través de lluvia.

1.2.2-Mercurio inorgánico (Hg^+ y Hg^{2+}).

En esta forma posee baja lipofilidad, de modo que la capacidad para atravesar membranas celulares disminuye. El Hg^{2+} viaja por el torrente sanguíneo debido a que se une a los grupos tiol de la cisteína en eritrocitos, glutatión y metalotioenina, o va suspendido en el plasma. Este es absorbido a través del tracto respiratorio y en menor extensión por la piel (5-8%) y tracto gastrointestinal (3-5%). La vía principal de excreción de esta especie es por la orina y las heces, con una vida media de aproximadamente dos meses¹³. Se ha demostrado que el producto de su enlace con la cisteína puede llegar a depositarse en el cerebro. A diferencia del mercurio elemental, no difunde a través de la barrera hematoencefálica; no obstante existen pruebas que demuestran que llega a la placenta y al líquido amniótico, a través del transporte mediante cisteína¹⁶.

1.2.3-Mercurio orgánico.

La forma principal en la que se encuentra el mercurio orgánico es como metilmercurio (MeHg), aunque también puede aparecer como etilmercurio y fenilmercurio. El MeHg puede atravesar la barrera hematoencefálica y placentaria. Con respecto a la última, dejaría vulnerable al feto, el cual también se vería afectado por la toxicidad del compuesto. Incluso, puede transmitirse mediante la leche materna. Los niños recién nacidos pueden asimilar el metilmercurio por esta vía, lo que resulta en una bioacumulación en el cerebro, riñones, hígado y músculos^{13,17}. El MeHg, es conocido como un potente agente neurotóxico, cuyo mecanismo de acción frente al sistema nervioso central ha sido estudiado en múltiples ocasiones. Dicho metal es 50 veces más tóxico que el Hg⁰. Según el ciclo global del Hg, una porción de la deposición del mismo sobre la superficie terrestre ocurre en las aguas superficiales y en zonas de humedales. Precisamente es aquí donde se produce la transformación del mercurio, ya sea en estado elemental o inorgánico a mercurio en estado orgánico.

El mercurio inorgánico se biometila producto de la acción de bacterias reductoras de sulfatos (BSR). Estas bacterias constituyen un grupo de procariotas que tienen en común la capacidad de realizar la reducción disimilatoria del sulfato a sulfuro, como un componente principal de sus procesos bioenergéticos. Se encuentran, fundamentalmente, en ambientes anóxicos, en los que la reducción de sulfato es la vía predominante de biomineralización anaeróbica. Es conocido que habitan en aguas, suelos, sedimentos, acuíferos, yacimientos de petróleo, aguas subterráneas, rizosfera de plantas, emisiones hidrotermales y tracto gastrointestinal de animales¹⁸. A pesar de que una pequeña porción del mercurio total está en forma de metilmercurio (menos de un 10% y 3% en agua y suelos/sedimentos, respectivamente) su formación es un paso de suma importancia en el ciclo del mercurio y la incorporación del mismo al organismo del ser humano¹³. Dentro de los factores que contribuyen a la biometilación se encuentran, la baja existencia de oxígeno y azufre en el área, lo que favorece la actividad de dichas bacterias. A ello se le agrega la existencia de especies solubles de carbono. En un hábitat terrestre o acuático que cumpla estas características y que, además, presente niveles de pH bajo, el ritmo de metilación del mercurio es elevado^{19,20}.

El MeHg, como forma orgánica más dañina, posee la capacidad de traspasar las membranas celulares y quedar retenido dentro del cuerpo. Esto es muy peligroso puesto que se estima que se bioacumula hasta un millón de veces a lo largo de la cadena trófica acuática. Se inicia este proceso desde la adquisición del metal por microorganismos como las BSR, hasta llegar a los organismos de la parte superior de la cadena alimenticia (peces depredadores y mamíferos). Este mecanismo de bioacumulación se basa en la adsorción en la superficie corporal y, principalmente, por ingestión de alimentos²¹.

1.3-Mecanismos de movilidad celular. Efecto neurotóxico del MeHg.

Diversos estudios explican que la movilidad del MeHg dentro del organismo tendría dos vías de transporte específicas en cuanto a entrada y salida de las células. El mecanismo de entrada se centra en el transporte a través de complejos formados con los aminoácidos cisteína y homocisteína. El compuesto que se forma se muestra como un mimético de la metionina, aminoácido comúnmente transportado hacia el interior de la célula por el sistema de transporte de L-aminoácidos (LAT). Esto se ha demostrado mediante exámenes in vitro donde se propició una sobreexpresión del sistema de transporte de aminoácidos neutros (LAT1) en células de ovario de hámster chino. Ante la presencia de MeHg se corroboró cómo en estas condiciones ocurría un incremento en la entrada del compuesto dentro de las células^{22,23}. De igual importancia son la glutamyltranspeptidasa y la dipeptidasa, enzimas responsables de convertir el metilmercurio extracelular en complejos con cisteína absorbibles por la membrana celular²⁴.

El Hg, una vez dentro de las células, se une al glutatión. Esta molécula la emplea como transporte para salir de las células, al hacer uso de las moléculas endógenas transportadoras de glutatión. Se ha observado cómo la existencia de MeHg en el organismo trae una desestabilización de la relación entre glutatión y glutatión oxidado (GSH/GSSG) y la disminución del GSH. Debido a que el glutatión es la principal molécula reguladora del estrés oxidativo, su detrimento influye en el equilibrio homeostático celular. Ello incrementa la cantidad de especies reactivas de oxígeno sumamente dañinas. Como consecuencia, el MeHg cumple un papel neurotóxico al alterar la regulación de especies oxidantes perniciosas en las neuronas.

Otro mecanismo relacionado con el efecto neurotóxico del MeHg es su influencia sobre el glutamato, mayor neurotransmisor vinculado al proceso de excitación del sistema nervioso en mamíferos. En función de la regulación de la concentración de glutamato extra-neuronal se puede estar en presencia de una acción normal y fisiológica del mismo o una acción patológica²³. Los principales receptores de glutamato para su recaptación postsináptica se encuentran en los astrocitos, los transportadores de glutamato/aspartato (GLAST) y los transportadores de glutamato tipo-1 (GLT-1). Precisamente en los astrocitos es donde se deposita fundamentalmente el MeHg. Una de las hipótesis establecidas es que, producto de la alta afinidad del MeHg por los grupos tiol en residuos de cisteína de los receptores de glutamato, se podría inhibir la actividad de los mismos. De esta forma estaría disminuyendo la recaptación de glutamato. A su vez, es bien conocido que el incremento de glutamato extra-neuronal no recaptado, incrementa la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) e influye en la disminución de la entrada de cisteína a las células. Al no producirse entrada de cisteína, vía transportadores de glutamato/aspartato, la producción de glutatión se ve afectada. La caída del nivel de glutatión terminará incrementando aún más el estrés oxidativo al que se someten las neuronas, razón por la que se atribuye una alta neurotoxicidad al MeHg²⁵.

1.4-Detección de Hg. Posibles estrategias y propuesta.

La necesidad de poder realizar mediciones lo más precisas y exactas posibles de los niveles del metal pesado en agua, alimentos y fluido sanguíneo se hace cada vez más urgente. Debido a las variadas formas por las que el Hg puede contaminar el medio ambiente se necesitan sensores que cubran el amplio espectro de posibles fuentes de contaminación; esto a su vez, ha de ir acompañado con el desarrollo de sensores específicos para cada fuente. Según la entidad que se analice se pueden encontrar datos disímiles en cuanto al nivel permitido de Hg en agua potable, alimentos o en sangre. Ejemplo de ello es que, según la OMS y los estándares de la Unión Europea, el límite permitido es de 1 ppb de Hg^{2+} en el agua potable. Por otro lado la Agencia de Protección Medioambiental de los Estados Unidos de América (EPA) asume que el límite permitido es de 2 ppb de Hg(II) ²⁶. Se han empleado diversos métodos analíticos en la detección de Hg. Entre ellos se encuentran la espectroscopía de absorción y emisión atómica, técnicas de medición de resonancia plasmónica superficial, espectroscopía de absorción de rayos-x²⁷ e incluso imagen de resonancia magnética²⁸.

A pesar de contar con estos métodos analíticos, altamente sensibles en algunos casos, muchos de ellos presentan serias desventajas, como, por ejemplo: suelen tener un coste elevado por análisis, requieren de personal técnico cualificado para su manejo, no suelen ser portátiles y, por tanto, no sirven para medidas in situ y, en ocasiones, necesitan de un pre-tratamiento más o menos complejo de la muestra. Estos métodos se centran en la detección de Hg, pero muchas veces no son capaces de discriminar entre la existencia de Hg inorgánico o Hg orgánico²⁹. Por ello es necesario desarrollar nuevos sensores capaces de detectar de forma selectiva, eficiente y sensible el nivel de mercurio, en definitiva una tarea de gran importancia.

En comparación con los métodos comentados anteriormente, los sistemas sensores suelen ser fáciles de usar, no requieren personal cualificado, son de bajo coste, portátiles y útiles para medidas in situ y pueden llegar a ser muy sensibles, selectivos y rápidos en el análisis³⁰. Se han diseñado múltiples variantes para los mismos; no obstante, es difícil reunir simultáneamente en un dispositivo todas las características deseables para poder tener un sensor óptimo. En ocasiones, se obtiene un sensor con la sensibilidad, selectividad y límite de detección adecuados, pero que no son viables desde un punto de vista práctico.

Los biosensores, un tipo específico de sensor químico se muestran, entonces, como una posible alternativa. Según la definición de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), un biosensor es aquel dispositivo para la detección de un analito que combina un componente biológico con un componente de detección físico-químico. En resumen será aquel dispositivo en el cual, como receptor del analito en cuestión, se tenga una biomolécula o componente biológico como una enzima, ADN, células, proteínas o anticuerpos, entre otros. El hecho de que el receptor sea una biomolécula permite que la selectividad del sensor se incremente aún más con respecto a un sensor químico³¹. Específicamente para la detección de mercurio se han diseñado varios biosensores. Según el principio

del transductor utilizado podemos encontrar sensores electroquímicos, ópticos o basados en materiales piezoeléctricos. De estos, los sensores ópticos son sumamente interesantes. Ellos se fundamentan en cambios en la absorbancia, luminiscencia, fluorescencia, dispersión de la luz o el índice de refracción cuando se da la interacción analito-receptor.

El desarrollo de transductores más eficientes también es parte importante en el sensor. Mejores transductores brindan la posibilidad de contar con nuevos mecanismos para convertir la señal bioquímica que se genere en el receptor en una señal medible. Con respecto a ello, el desarrollo de la nanotecnología ha jugado un papel esencial. Un ejemplo de esto son las propiedades únicas que poseen las nanopartículas de oro (AuNPs) para ser empleadas en este campo³¹⁻³³.

Las AuNPs son biocompatibles, lo cual no limitaría el empleo del biosensor a muestras de agua o comida; se podría incluso tener biosensores capaces de ser empleados *in vivo* y poder monitorizar en tiempo real los niveles de Hg. La síntesis de AuNPs permite resultados, por lo general, de buena reproducibilidad y los procedimientos para ello están bien estudiados³⁴⁻³⁹. Otra característica de las AuNPs es la fácil funcionalización de las mismas, lo que permite recubrirlas de forma simple con receptores que sean agentes biológicos. Las AuNPs forman enlaces estables con grupos tiol o amino. Esto permite que se tengan hoy en día sensores basados en AuNPs recubiertas con antígenos, enzimas, ADN o péptidos. Lo más distintivo y la principal ventaja de emplear este tipo de sistema es aprovechar el desplazamiento de la longitud de onda de la banda de resonancia plasmónica del oro^{40,41}.

Las AuNPs, en dependencia de su tamaño, van a poseer una banda de resonancia plasmónica determinada. Para nanopartículas de aproximadamente unos 15 nm se estima que dicha banda se encuentra sobre los 520 nm de longitud de onda⁴². En base a ello, el hecho de disponer de un recubrimiento selectivo para el Hg, provocaría un aglomeramiento de las nanopartículas. Dicha agregación podría incluso ser detectable a simple vista, por lo que sería útil en la detección rápida e *in situ* del Hg.

Históricamente, para las terapias de quelación de Hg se han empleado moléculas que poseen grupos tiol. Un ejemplo de ello son el ácido etilendiaminotetraacético (AEDT), el dimercaprol (BAL), el ácido lipóico, el ácido dimercaptosuccínico (DMSA) y el ácido 2,3-dimercapto-1-propanosulfónico (DMPS). Actualmente se buscan estrategias de quelatación del Hg que den mejores resultados e incluso se ha estudiado el posible empleo de aminoácidos como L-cisteína y metionina para dicha función. En el caso de los biosensores, los receptores basados en cisteína se vuelven cada vez más interesantes. El empleo de metalotioeninas, la enzima ureasa, glutatión o recubrimientos con la propia cisteína se analizan con más frecuencia. El hecho de que el Hg sea afín a estos receptores, que su detección sea selectiva y sensible y la funcionalización en AuNPs sea simple, apunta a un biosensor que podría servir de solución a los inconvenientes de las técnicas de medición convencionales.

Objetivos

El presente trabajo fin de máster tiene como objetivo principal, realizar una revisión bibliográfica sobre los biosensores actuales confeccionados para la detección de mercurio. Específicamente aquellos en los que se utiliza como molécula receptora del analito, L-cisteína o compuestos análogos y que como transductor empleen nanopartículas de oro.

Para cumplir con este objetivo se proponen analizar los siguientes tópicos:

- Definir que es un biosensor.
- Clasificar los biosensores según el bioreceptor empleado y principio físico-químico de transducción.
- Hacer un análisis de las principales variantes de biosensores electroquímicos empleados para la detección de mercurio, en los que se utilicen moléculas receptoras basadas en L-cisteína y compuestos análogos ricos en este aminoácido, o grupos tiol.
- Hacer un análisis de los principios de funcionamiento de los biosensores ópticos.
- Analizar biosensores ópticos basados en AuNPs funcionalizadas con L-cisteína y compuestos análogos, que se utilicen para la detección y cuantificación rápida, sensible y eficaz de Hg.

Como culminación del análisis bibliográfico y del trabajo fin de master se realiza una propuesta experimental, que contempla el diseño de un biosensor óptico-colorimétrico para la detección de mercurio. En este se propone combinar AuNPs como transductor y moléculas de quelatación del mercurio clásicas como el ácido dimetilsulfónico y aminoácidos como L-cisteína simultáneamente. Su objetivo es ser utilizado para la detección de Hg en muestras de agua y fluido sanguíneo.

Materiales y Métodos

Para la confección del presente trabajo se utilizaron disímiles motores de búsqueda bibliográfica como Web of Science, Google Scholar, Scopus, PubMed y Elsevier, entre otros. Las palabras claves y combinaciones utilizadas para la búsqueda, según cada capítulo, se muestran a continuación.

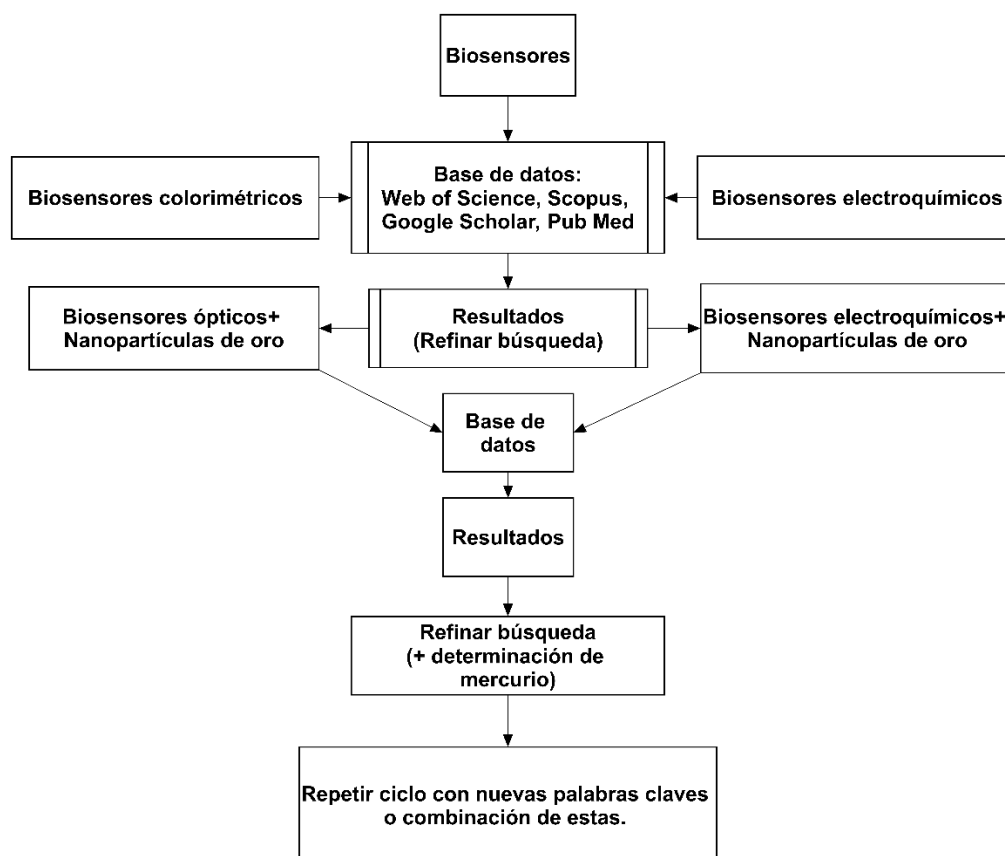
Capítulo 1: Mercury, mercury cycle, anthropogenic emissions + Hg, biosensors + advantages, Hg biomagnification, Hg applications, Hg + toxicity, AuNPs, biosensors.

Capítulo 2: Biosensors + classification, Transduction, sulfur containing aminoacids, biocatalytic receptors, bioaffinity receptors, aptamers, metallothionein, sulfhydryl group + biomolecules, urease, glutathione.

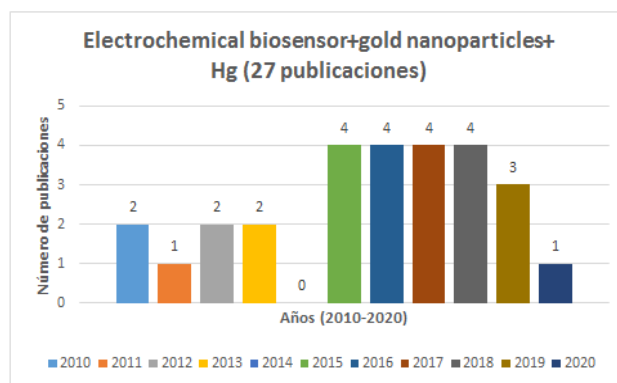
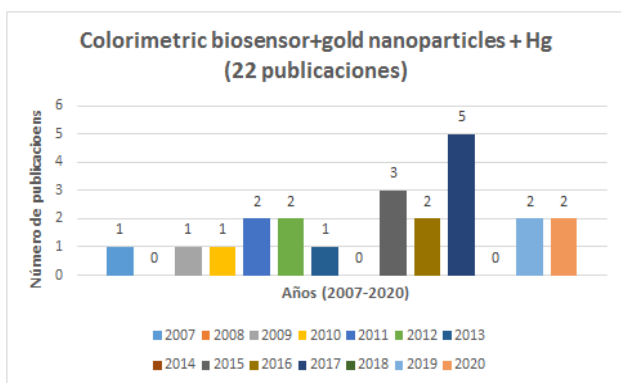
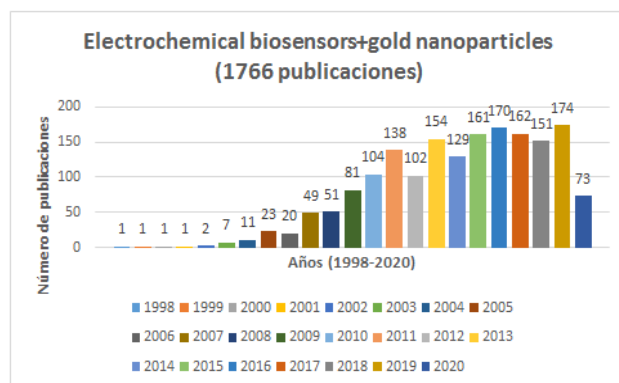
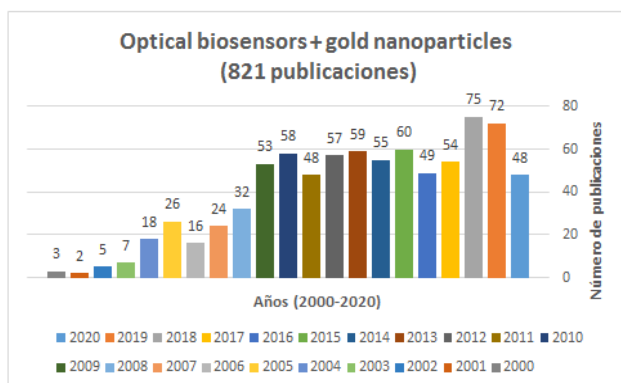
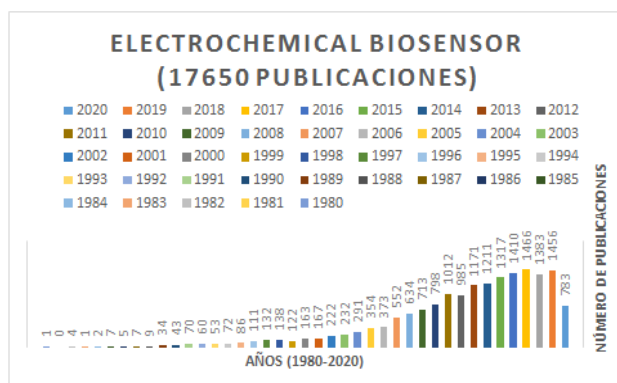
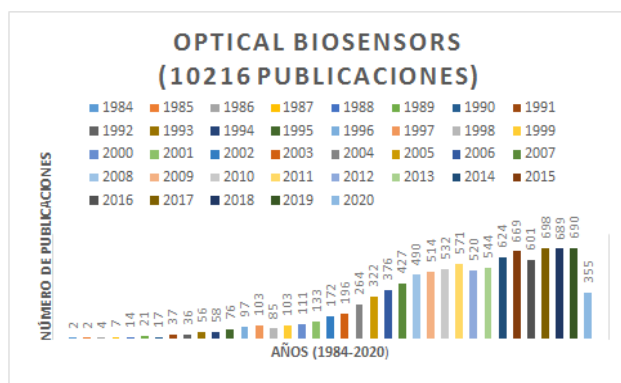
Capítulo 3: Electrochemical biosensors + AuNPs + Hg, electrochemical biosensor + cysteine + Hg, amperometry, voltammetry, glassy carbon electrode + AuNPs + Hg, urease based electrochemical biosensor + Hg.

Capítulo 4: Optical biosensor classification, colorimetric biosensors, gold nanoparticles + colorimetric biosensors, surface plasmon resonance, optical fiber, field effect transistor + AuNPs + mercury, glassy carbon electrode + cysteine + Hg.

En el esquema siguiente se ilustra el algoritmo de búsqueda seguido para la realización de la revisión bibliográfica.



Según el algoritmo de búsqueda seguido, se fue depurando el material de consulta encontrado en los motores de búsqueda mencionados. Se ilustra cómo, a medida que se sigue el esquema diseñado, se hacen más específicos los resultados y el contenido bibliográfico. En este caso, los datos que se muestran fueron obtenidos mediante la base de datos Scopus. Se procede de la misma forma para el resto de motores de búsqueda.



De las publicaciones encontradas, se presta especial atención a aquellas en las que las nanopartículas de oro en el biosensor se encuentren recubiertas con elementos receptores contenedores de grupos tiol o cisteína y compuestos análogos para incrementar la sensibilidad y selectividad del biosensor.

Capítulo 2: Biosensores y generalidades.

Previamente se han definido los biosensores, según la IUPAC, como aquellos dispositivos para la detección de un analito que combinan un componente biológico con un componente de detección físico-químico. En ellos, un componente receptor de naturaleza biológica es combinado con un transductor. El transductor se encargará de convertir la señal generada en la interacción analito-receptor en una señal analítica útil y fuente de información procesable. Los receptores biológicos proporcionan ciertas ventajas en el proceso de captación del analito. Entre estas se tiene que poseen una alta selectividad, sensibilidad, facilidad para automatizarlos, capacidad de realizar mediciones en tiempo real y un corto tiempo de análisis. En la Figura 2 se ilustran esquemáticamente los componentes de un biosensor, destacándose algunos bioreceptores de uso común y los tipos de transducción que pueden emplearse.

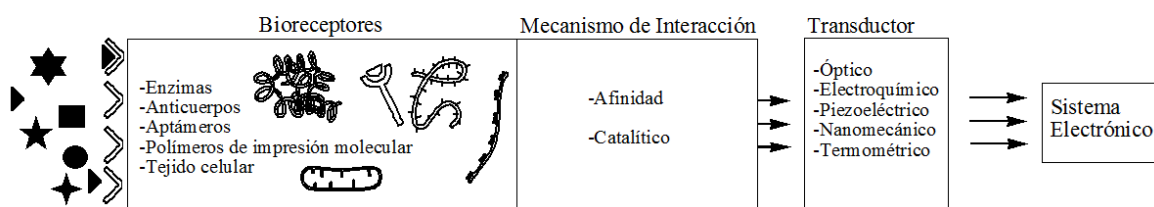


Figura 2: Ilustración esquemática de un biosensor.

Debido a la necesidad de selectividad y sensibilidad, los biosensores poseen ventaja con respecto a los sensores con receptores no biológicos. Esto viene dado por la mayor versatilidad de los elementos biológicos a la hora de emplearse como elementos de reconocimiento. Los biosensores se pueden clasificar según el proceso de transducción y según la forma de interacción elemento biológico receptor-analito. Antes de pasar al análisis de los diferentes biosensores diseñados para la detección de Hg, se hace un resumen de las características principales de cada una de las clasificaciones mencionadas.

2.1-Biosensores según el tipo de transductor:

2.1.1-Electroquímicos:

Caracterizados por su capacidad de convertir la señal obtenida en una señal eléctrica. En este caso se emplea la energía producida por la interacción electroquímica del receptor biológico-analito para producir una señal analizable. En dependencia del cambio censado por el transductor se diferencian cuatro tipos de biosensores electroquímicos. Estos son los sensores conductimétricos, potenciométricos, amperométricos e impedimétricos, en función de si detectan cambios en la conductividad, en el potencial, en una corriente generada o en la impedancia. Es común que se empleen este tipo de transductores con receptores de tipo biocatalíticos como, por ejemplo, enzimas. Ello viene dado en gran parte por la aparición de sustancias electroactivas que suelen generarse en las

reacciones enzimáticas. Aun así, también es posible el empleo de anticuerpos^{43,44}, como receptores biológicos, empleando en estos casos, configuraciones tipo sándwich: un anticuerpo primario inmovilizado en la superficie del transductor, el analito unido a dicho anticuerpo primario y, finalmente, un anticuerpo secundario marcado con una enzima.

2.1.2-Ópticos:

Se basan en cambios en las propiedades ópticas de la radiación electromagnética que se emplea y que detecta el transductor, producto de la acción biocatalítica o de bioafinidad con el receptor. La variación en la señal óptica del transductor se relaciona con la muestra a detectar. Fundamentalmente emplean los cambios en fenómenos de absorción de la luz, dispersión Raman, dispersión de la luz e índice de refracción, donde se incluye el conocido efecto de resonancia plasmónica superficial⁴⁵.

2.1.3-Piezoeléctricos:

Conocidos como sistemas de transducción másicos, gravimétricos o acústicos, constituyen un material piezoeléctrico (cristales), caracterizado por entrar en resonancia ante la exposición a un campo electromagnético y soportar el elemento de reconocimiento⁴⁶. El efecto piezoeléctrico es una capacidad o propiedad de algunos materiales para generar voltaje ante la presencia de un estrés mecánico. Dicho efecto funciona en el sentido inverso de modo que la aplicación de voltaje alternado sobre el material produce oscilación o vibración del mismo⁴⁷. Esto se emplea en la construcción de biosensores, puesto que la deposición de un analito sobre un receptor en la superficie del piezoeléctrico modifica la masa sobre este. Junto al cambio de masa se produce un cambio en la frecuencia de vibración del piezoeléctrico.

2.1.4-Termométricos:

Estos biosensores emplean para su funcionamiento la propiedad más básica de una reacción química, la absorción o generación de calor. Lo que se mide finalmente es la variación en la temperatura en el medio de reacción⁴⁸, bien de manera directa o bien de forma indirecta (medidas de variación en la resistencia eléctrica: termistores, que son directa o inversamente (más abundantes) proporcionales a la variación de la temperatura). De gran robustez en reacciones enzimáticas y proceso exotérmicos, en las cuales la transferencia de calor se puede relacionar con la concentración del analito de interés, ha permitido determinar valores de pK para sustancias a muy baja concentración. Explotan cambios entálpicos en las reacciones para realizar las mediciones⁴⁹.

2.1.5-Nanomecánicos:

Son de gran impacto y proyección en estudios de genotoxicidad. Constituidos por una microplaca de silicio donde se inmoviliza el elemento de reconocimiento biológico (anticuerpos), la determinación se efectúa por medio del cambio en la tensión superficial entre los dos componentes. Uno de los

trabajos de mayor impacto en esta tecnología fue el desarrollado para la determinación del pesticida DDT a concentraciones inferiores a las nanomolares⁴⁶.

2.2-Biosensores según el tipo de receptor biológico.

Desde el punto de vista de cómo interactúa el analito con el receptor, se clasifican en biosensores catalíticos y biosensores de afinidad.

2.2.1-Biosensores catalíticos:

Los biosensores catalíticos son aquellos en los que la interacción analito-elemento biológico receptor, ocurre a través de una reacción química. Estos sensores se basan en la utilización de elementos biológicos que funcionan como catalizadores. Dichos catalizadores median en una reacción química, en la que intervienen uno o varios sustratos, para generar uno o varios productos. Finalizado el proceso, el biocatalizador se regenera y puede ser nuevamente utilizado. Ejemplos de elementos biológicos empleados en este tipo de sensor pueden ser: enzimas inmovilizadas aisladas o paquetes multienzimáticos coinmovilizados, que actúan de modo encadenado, orgánulos celulares, células completas (microorganismos) y tejidos animales o vegetales⁵⁰. El diseño de biosensores de este tipo puede estar orientado hacia un proceso de activación de la enzima por parte del analito o de un proceso de inhibición⁵¹⁻⁵³.

Para el caso específico de la detección de Hg, se emplean enzimas con las que el metal actúa como inhibidor. Los principales ejemplos son biosensores basados en ureasa (aminohidrolasa), glucosa oxidasa (GOx) y peroxidasas de rábano picante. Específicamente el empleo de GOx es uno de los más extendidos. La glucosa oxidasa cataliza la oxidación de glucosa, generándose H_2O_2 . La concentración de H_2O_2 se determina luego por amperometría. El principio de detección de Hg se centra en que este inhibe la enzima, de modo que se genera poco H_2O_2 lo que permite determinar entonces de modo indirecto la cantidad de Hg en la muestra²⁶. La interacción con este tipo de enzimas por parte del Hg se adjudica a la afinidad del metal por formar enlaces covalentes con grupos tiol presentes en cisteína en la cadena polipeptídica de la proteína, sobre todo en su sitio activo. Si bien las enzimas son muy selectivas, el empleo de las mismas para detección de Hg implica que se deba regenerar el sensor posteriormente. Ello viene dado por la fuerte naturaleza del enlace Hg-sitio activo. Esto puede conllevar problemas de envenenamiento del sensor y dificultad en su capacidad de reutilización. No obstante, son unos de los sensores más empleados. Algunos ejemplos de biosensores se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: Ejemplos de sensores electroquímicos-enzimáticos para detección de Hg

<i>Material del electrodo</i>	<i>Variante electroquímica del sensor</i>	<i>Enzima empleada</i>	<i>Rango linear del biosensor / μM</i>	<i>Límite de detección / μM</i>	<i>Ref.</i>
Electrodo de pH/AuNPs	Potenciométrico	Urs	0.09-1.99	0.05	⁵⁴
ISFET	Potenciométrico	Urs, AChE, BCHE	10-50	10	²⁶
ZnO-NRs	Potenciométrico	GOX	0.05-2000	0.5	⁵¹
Electrodo de platino	Amperométrico	GOX	5-180	2.5	⁵⁵
CPE	Amperométrico	GOX	10-160	2.5	⁵⁶
GCE/MWCNT-RuO ₂ /Nafion®	Amperométrico	GOX	5-80	1.0	⁵⁷

AChE: acetilcolinesterasa, BCHE: butirilcolinesterasa, NRs: nanorods, SPCE: electrodo de carbono serigrafiado. Urs: ureasa, GOx: glucosa oxidasa, GCE/MWCNT: electrodo de carbono vitrificado cubierto con multicapas delgadas de nanotubos de carbono, ISFET: ion selective field effect transistor (transistor de efecto de campo de ion selectivo) y CPE: carbon paste electrode (electrodo de pasta de carbono).

2.2.2-Biosensores de afinidad:

Los biosensores de afinidad se basan en la interacción del analito de interés con el elemento de reconocimiento, sin la existencia de una reacción catalítica. La interacción conlleva la modificación de un equilibrio en el que se forma un complejo analito-receptor. Para cuantificar la interacción, puede recurrirse a métodos directos, tipo sándwich, de desplazamiento y competitivos. Por lo general, se emplean marcadores en el receptor implicado en la interacción o en algún reactivo, que producto de la mayor afinidad analito-receptor, se desplaza del mismo. Como marcadores se utilizan compuestos fluorescentes, nanopartículas o enzimas que intervengan en una reacción complementaria transducible, con la que se asocia el mecanismo de detección⁵⁰.

Los anticuerpos son los elementos más empleados en este tipo de sensores siendo conocidos como inmunosensores. En un inmunosensor la reacción inmunoquímica se acopla al transductor. Su funcionamiento se centra en la interacción antígeno-anticuerpo y la formación de un complejo estable. Hasta el momento los anticuerpos se han empleado con transductores ópticos, donde la regeneración del inmunosensor representa la etapa más limitante de su empleo al condicionar su reutilización. Conseguir selectividades y límites de detección adecuados, requiere de la formación de complejos antígeno-anticuerpo de elevada afinidad. Esto, precisamente, es lo que complica y limita la utilización del sensor. La disociación del antígeno a detectar, frecuentemente, es difícil. También es importante minimizar las interacciones no específicas que conducen a falsos positivos⁵⁸.

2.2.3-Receptores ricos en cisteína.

A pesar de existir muchos tipos de biosensores, los que utilizan compuestos receptores ricos en grupos tiol se muestran muy prometedores para la detección de Hg. Por ello este trabajo se centra en los

biosensores para la detección de Hg que empleen bioreceptores ricos en cisteína, y que preferentemente utilicen AuNPs en la transducción de la bioseñal.

La teoría de Pearson postula que una base blanda reacciona preferiblemente con un ácido blando de modo que se obtiene un enlace estable entre ambos. Según esta teoría la interacción Hg(II) y compuestos con grupos tiol (-SH) va a estar favorecida al ser ambos un par ácido-base blando. Siguiendo este principio se pueden diseñar biosensores en los que se aproveche la afinidad por formar enlace entre ambas especies. Para ello se necesita disponer de moléculas que sean ricas en este grupo funcional (-SH) o compuestos que contengan en su estructura dichas moléculas. Esto lo podemos encontrar en los denominados aminoácidos contenedores de azufre. Existen cuatro aminoácidos de este tipo: cisteína, metionina, homocisteína y taurina⁵⁹, cuyas estructuras se muestran en la Figura 3.

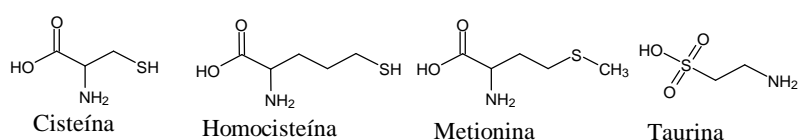


Figura 3: Aminoácidos contenedores de azufre.

Dentro de las proteínas ricas en cisteína se encuentran las metalotioeninas. Estas proteínas son de bajo peso molecular (6000-7000 Da) y poseen hasta un 30% de cisteína en su estructura. Tienen alta afinidad por metales como Zn, Cd, Cu y Hg. Las metalotioeninas presentes en los mamíferos cuentan con 20 residuos de cisteína que pueden estar unidos consecutivamente o con uno o dos aminoácidos entre ellos⁶⁰. Por otro lado, la ureasa es una enzima rica en cisteína frecuentemente empleada en los sensores electroquímicos de tipo enzimáticos. La ureasa tiene como rol biológico hidrolizar la urea generándose amonio y dióxido de carbono. Según estudios de la estructura de la enzima en judías se considera que la ureasa posee de 840 aminoácidos, 90 que se corresponden con cisteína⁶¹. Esto la vuelve una enzima rica en aminoácidos con grupo tiol, factor que puede explotarse en el diseño de biosensores para la detección de Hg.

Otro candidato a emplear es el tripeptido no proteico glutatión constituido por tres aminoácidos: glutamato, cisteína y glicina. Contiene un enlace peptídico entre el grupo amino de la cisteína y el grupo carboxilo de la cadena lateral del glutamato. Se trata del principal antioxidante de las células, es ubicuo y ayuda a protegerlas de las especies reactivas del oxígeno, como los radicales libres y los peróxidos⁵⁹.

A continuación se discuten biosensores electroquímicos y ópticos para la detección de Hg. Los mismos se han seleccionado al ser los más empleados para este fin. En el caso de los biosensores ópticos se tratan con una mayor rigurosidad al ser la base de la propuesta de biosensor que se aborda en este trabajo.

Capítulo 3. Biosensores electroquímicos para la detección de mercurio.

En el capítulo anterior se ha realizado un breve resumen de los distintos tipos de biosensores y sus componentes. Concretamente, para la detección de Hg es común el manejo de bioreceptores constituidos por moléculas fluorescentes como la rodamina, cadenas de ADN ricas en timina (ver Anexo 1) e incluso el empleo de recubrimientos de AuNPs sobre electrodos. En el caso de las AuNPs se aprovecha la facilidad de formación de amalgamas entre el oro y el mercurio, y se combina con un transductor de tipo electroquímico⁶² u óptico⁶³. En la Tabla 2 se ilustran ejemplos de biosensores empleados frecuentemente.

Tabla 2: Biosensores para la detección de Hg y su funcionamiento.

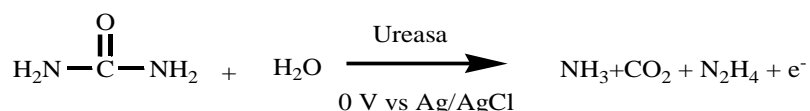
<i>Diseño del biosensor y clasificación.</i>	<i>Mecanismo de funcionamiento</i>	<i>Rango lineal de detección / nM</i>	<i>Límite de detección / nM</i>	<i>Ref</i>
FET de grafeno modificado con aptámero. Biosensor electroquímico	Medición de cambio de voltaje en la compuerta del FET por interacción del recubrimiento rico en timina del aptámero con el Hg.	0.1-100	0.04	⁶⁴
AuNPs funcionalizadas con Rodamina 6G (R6G) -ácido mercaptosuccínico (MPS). Biosensor óptico.	La R6G depositada en la superficie de las AuNPs emite fluorescencia. En presencia de Hg(II) se desplaza la R6G de la superficie de las nanopartículas y se observa una caída en la intensidad de la señal de fluorescencia medida.	-----	0.0006	⁶⁵
Cadenas de ADN inmovilizadas en ITO. Presencia de EXO III (enzima digestora de ADN). Biosensor electroquímico	Basado en la interacción Hg-timina. En presencia de Hg se entrecruzan las cadenas de ADN sobre el electrodo de ITO. La presencia de EXO III digiere la doble cadena de ADN formada y las diferencia de potencial electrostático entre las cadenas de ADN y el electrodo se mide por voltamperometría diferencial de impulso. El cambio en la medición se correlaciona con la presencia de Hg (II) y su concentración.	1.0-500	0.38	⁶⁶
Síntesis enzimática in-situ de AgNPs mediada por acción de peroxidasa de rábano picante (PRP). Sensor óptico de absorbancia.	La reacción enzimática de PRP en presencia de AgNO ₃ y NaBH ₄ favorece la formación de AgNPs. En presencia de Hg(II) inhibe la actividad de la RPR. De este modo, la existencia de Hg(II) en la muestra evita la formación de AgNPs y favorece su agregación. Se mide la absorbancia de las AgNPs y se correlaciona la disminución de la intensidad de su pico de absorción con la concentración de Hg(II) que inhibe su formación.	10-100	2860	⁶⁷

3.1-Biosensores electroquímicos basados en cisteína.

Los biosensores electroquímicos son poseedores de alta selectividad y sensibilidad, bajo coste, portabilidad, bajo tiempo de medición y son muy adecuados para mediciones en tiempo real²⁶. Esta es una muy buena carta de presentación para su empleo en la detección de Hg. A continuación, se describen algunas experiencias con biosensores electroquímicos donde el elemento de reconocimiento emplea cisteína o su acción se basa en la presencia de este aminoácido en su estructura.

3.1.1-Detección amperométrica de Hg empleando enzima ureasa como bioreceptor.

Este ejemplo de biosensor se basa en la inhibición electroquímica de la ureasa por el Hg. La arquitectura del mismo se compone de un electrodo de platino recubierto por nanopartículas de óxido de cerio, con ureasa inmovilizada en su superficie empleando Nafion® (Pt/CeO₂/URs)⁶⁸. El empleo de la ureasa y la interface de nanopartículas de CeO₂ garantizan que exista una interacción eléctrica fuerte entre ambas partes del biosensor, lo que le brinda una buena sensibilidad. Esto se explica por la diferencia en los puntos isoeléctricos de cada componente del sensor (4.9 para la ureasa y 9.2 para las NPs de CeO₂)^{68,69}. En este caso, la medición del Hg se realiza en muestras de H₂O. La reacción principal de la ureasa con la urea se muestra en la siguiente ecuación.



Para la medición de la concentración del analito se determina primeramente la máxima concentración a la que la ureasa está en equilibrio con su sustrato (urea). Esto se hace por mediciones de corriente generada por la actividad de la enzima a partir de voltamperometría cíclica. La corriente se mide para el rango de voltaje de -0.2 a 0.8 V con respecto a un electrodo de referencia de Ag/AgCl. Se van adicionando al electrodo de trabajo, en este caso Pt/CeO₂/Urs, concentraciones diversas de urea de (0.1-1.8 μM) hasta que la corriente medida es constante y se obtiene el valor de equilibrio entre la ureasa-urea (concentración de saturación de la enzima: 1.5 μM). Con este dato se mide entonces la inhibición de la enzima por el Hg. Se adicionan concentraciones de Hg de modo que al interactuar con el sitio activo de la enzima e inhibirla, evita que se dé la reacción catalítica de la misma con su sustrato. En resumen, con este tipo de sensor se observa que la reacción redox no tiene lugar o se entorpece; esto se refleja en una disminución de la señal detectada en la medición amperométrica, que se correlaciona con la concentración creciente de iones Hg(II) en la muestra.

3.1.2-Detección de mercurio mediante electrodos de óxido de grafeno recubiertos con cisteína.

Este biosensor se basa en la preparación de un nanocompuesto de óxido de grafeno recubierto con polivinilpirrolidona (PVP) y funcionalizado con L-cisteína⁷⁰. El óxido de grafeno posee una gran área superficial, actividad electrocatalítica y capacidad de transporte de carga. Para evitar su aglomeración se recubre con PVP. Posteriormente se conjuga cisteína a la superficie del sistema. De esta forma se

cuenta con una plataforma electroquímica que posee buenas características eléctricas y una gran área superficial recubierta con una molécula con afinidad por el Hg(II). El biosensor se emplea con la técnica de voltamperometría de redisolución. En una primera etapa, la voltamperometría de redisolución anódica pre-concentra el analito mediante su reducción en una película delgada sobre el electrodo de trabajo. Adicionalmente, en una segunda etapa, conforme el potencial se vuelve más positivo, se oxida la especie pre-concentrada sobre la superficie del electrodo en la disolución⁷¹. La corriente medida durante la oxidación es proporcional a la cantidad de analito que se deposite. En el ejemplo conciso que se muestra el rango de potencial empleado en el experimento es de -0.1 a 0.5 V, con los siguientes parámetros de medida: amplitud de 25 mV e incremento de potencial de 4 mV. El dispositivo diseñado mostró un rango lineal de detección para concentraciones de Hg(II) entre 0.1 y 0.6 μM . El pico de la oxidación del analito se detectó para un potencial de 0.19 V. Además de esto, el sensor fue selectivo con respecto a otros iones de metales pesados. En la Figura 4 se muestran gráficos obtenidos en el artículo de referencia consultado.

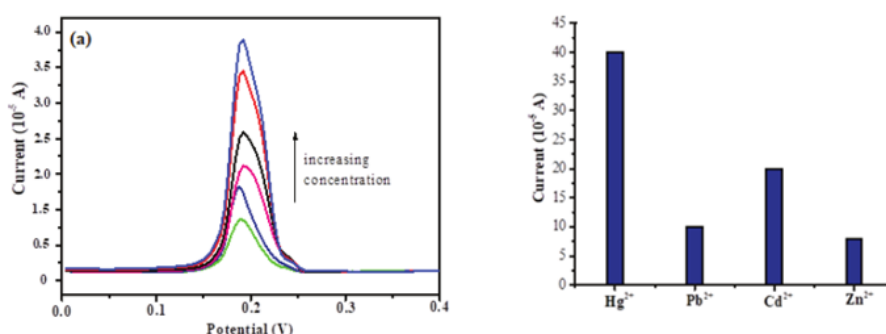


Figura 4: Gráficos que muestran el pico de la señal de la oxidación del Hg(II) a 0.19 V y estudio de selectividad del nanocomposito diseñado según Ref⁷⁰

Este tipo de dispositivos se muestra como un sistema eficiente que permite la detección de Hg incluso en presencia de otros metales pesados. El nanocompuesto utilizado puede servir de receptor para varios electrodos de carbono vitrificado. También podría extrapolarse su empleo a transductores de otra naturaleza como AuNPs en biosensores ópticos.

3.1.3-Detección de Hg con biosensor electroquímico basado en metalotioenina.

La metalotioenina tiene alta afinidad por el Hg; esto ha sido estudiado en varios ensayos realizados en los que se analiza el desplazamiento de otros metales en la metalotioenina por el Hg⁷². La metalotioenina recombinante humana de isoforma (1a) es de las más empleadas en el campo de los biosensores. En el ejemplo que se muestra, la metalotioenina se adsorbe físicamente sobre un disco de papel. Dicho disco se inmoviliza sobre electrodos de carbono serigrafiados. Para este dispositivo se probaron concentraciones desde 5 a 1000 ppb. Al parecer la metalotioenina, en dependencia del pH de la muestra, presenta mayor afinidad por un metal pesado u otro (dígase Cd, As, Zn, Cu o Hg). La determinación de Hg se realizó empleando también la técnica de voltamperometría de redisolución

anódica. Los parámetros del estudio fueron: 350 mV de potencial de deposición, tiempo de deposición de 150 s, rango de voltaje empleado de 0.2-0.3 V y velocidad de barrido de 100 mV/s. La medición de Hg(II) tuvo un límite de detección de 45 ppb⁷³. Aun cuando este valor no es el recomendado por la OMS en agua potable, si puede servir de referencia para el análisis y determinación de presencia de contaminación. Otro sensor similar al anterior es el diseñado con electrodos de discos de oro⁷⁴. En este caso se modifica igualmente la superficie del electrodo con metalotioenina.

3.2-Biosensores electroquímicos basados en AuNPs para la detección de Hg.

Los materiales nanométricos poseen una relación área superficial - volumen que favorece la adsorción de compuestos sobre ellos. Las AuNPs son de fácil funcionalización con biomoléculas y afines a formar enlaces con Hg, poseen actividad catalítica, buena conductividad y pueden optimizar las reacciones de transferencia electrónica, lo que incrementa y hace más eficiente la ejecución analítica del biosensor⁷⁵. Por ello se emplean comúnmente como recubrimiento de electrodos donde son inmovilizados en modo de capas en su superficie. Técnicas de reiterada implementación en el mecanismo de funcionamiento de estos biosensores son la voltamperometría y sus variantes, como la voltamperometría cíclica, voltamperometría de onda cuadrada y voltamperometría de redisolución catódica o anódica, como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3: Algunos sensores para detección de Hg basados en AuNPs.

<i>Biosensor</i>	<i>Método de determinación</i>	<i>Resultados obtenidos</i>	<i>Ref.</i>
Electrodo recubierto con AuNPs y 2,4,6-trimercaptotriazina	Voltamperometría de redisolución anódica	Rango lineal de detección: 16 - 2000 nM Límite de detección: 5.3 nM	76
Electrodo de carbono vitrificado recubierto con AuNPs.	Voltamperometría de redisolución anódica de onda cuadrada	Concentración detectada: 0.019 nM	77
ITO recubierto con AuNPs	Voltamperometría de redisolución anódica de onda cuadrada	Límite de detección: 0.15 nM.	62
Transistor de efecto de campo basado en nanoláminas híbridas de MoS ₂ y AuNPs funcionalizadas con ADN.	Medición de la conductividad eléctrica en el FET.	Límite de detección: 0.1 nM	78
Electrodo de carbono vitrificado modificado con AuNPs funcionalizadas con aptámero rico en timina.	Voltamperometría diferencial de impulso.	Límite de detección: 0.005 nM Rango lineal de detección: 0.01-500 nM	75

ITO: Indium-tin-oxide: electrodo de óxido de estaño e indio; FET: field effect transistor: transistor de efecto de campo

Las técnicas de medición voltamperométricas basadas en la adsorción/desorción del analito a medir requieren de tiempos de pre-concentración de la muestra adecuados y que hay que optimizar experimentalmente. En este método, el analito se deposita o inmoviliza sobre el electrodo de trabajo y, posteriormente, se libera por alguna técnica de voltamperometría, en la que la cantidad de carga eléctrica empleada se correlacionará, según la primera ley de Faraday, con la concentración de la muestra a determinar⁷⁹. La duración de la etapa de pre-concentración o absorción del analito a medir sobre el electrodo de trabajo influye significativamente en la sensibilidad de la medición.

Para la construcción de biosensores electroquímicos es habitual emplear electrodos de carbono vitrificado, donde se depositan las nanopartículas, usualmente, por electrodeposición. En función de la morfología de las nanopartículas depositadas y el método y condiciones de electrodeposición que se emplee, el resultado obtenido a la hora de determinar la concentración de Hg en una muestra puede variar⁷⁹. Se debe tener en cuenta que es común funcionalizar la superficie de las nanopartículas con biomoléculas que puedan favorecer aún más la selectividad del biosensor.

En adición a estos biosensores también se han desarrollado combinaciones muy interesantes. Este es el caso de biosensores de electroquimioluminiscencia (EQL) y biosensores basados en modificación electroquímica del fenómeno de resonancia plasmónica superficial. En el primer caso, se emplea un sistema de tres electrodos. En el electrodo de trabajo, para un potencial determinado ocurre una reacción electroquímica en su superficie que produce una reacción de quimioluminiscencia. Como recubrimiento que emita luz es común emplear complejos de rutenio. Estos complejos reaccionan transformando la señal eléctrica en luminosa⁸⁰. Ejemplo de ello es utilizar tris-(2,2-bipiridina)rutenio (II), $(\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+})$ y su reacción con tripropilamina, en la cual se genera un estado excitado del complejo de rutenio que termina retornando a su estado base con la emisión de un fotón de longitud de onda de 620 nm. Para estos sensores se han utilizado AuNPs como amplificadores de la señal luminosa gracias a sus propiedades ópticas. En este caso las AuNPs estarán recubriendo el electrodo de trabajo y, sobre ellas, se depositan los complejos de rutenio.

Un ejemplo de aplicación en la detección de Hg es la combinación de cuentas magnéticas y un sensor EQL semejante al descrito. En este se recubren cuentas magnéticas con una cadena de ADN, a modo de sistema de captura del Hg. Además se tendrán AuNPs donde se deposita un complejo de rutenio a través de un compuesto enlazante de cisteamina, y otra cadena simple de ADN. Las cuentas magnéticas sirven para captar el Hg, a su vez este se enlaza simultáneamente con el ADN en ellas y en las AuNPs. Luego se procede a depositar esta sonda en un electrodo y medir la señal del EQL. Este tipo de biosensor es una combinación de biosensor electroquímico y óptico donde se explotan las propiedades de las AuNPs, útiles para ambos. Para el ejemplo ilustrado en la detección de Hg se ha logrado obtener un límite de detección de 0.05 nM en muestras de agua⁸¹. En la Tabla 4 se muestran más ejemplos de biosensores electroquímicos no comentados en el presente epígrafe, así como

algunos de los mencionados. De esta forma se pueden comparar los mismos y analizar sus potencialidades.

Tabla 4: Biosensores electroquímicos para la detección de Hg.

Biosensor electroquímico para determinación de Hg	Rango lineal del biosensor / nM	Límite de detección / nM	Método de medición	Ref.
Electrodo de (Pt/CeO ₂ /ureasa)	200-800	18	Amperometría	68
Electrodo (SPCE/AuNPs/ureasa)	6-60	56	Amperometría	82
Electrodo (SPCE/ureasa)	2000-20000	4200	Amperometría	82
Electrodo GCE/(CS/AuNPs) ₂ / aptámero	0.01-500	0.005	DPV	75
Electrodo (Au/ADN-MB-Fc)	0.5-5000	0.08	DPV	83
Electrodo (Au/aptámero-HRP)	0.5-1000	0.3	Voltametría cíclica	84
Electrodo SPGE/aptámero-Fc	1-10000	0.6	Voltametría cíclica	85
Nafion/cys-Au-Ag-BMNPs/GCE	0.005-95	0.0005	DPV	86
Electrodo Au/cys/GSH-Au NPs/DNA	0.05-100	0.05	DPV	87
Electrodo de GR/AuNPs-FC	0.025- 10 mM	0.005	DPV	88
FET/ MoS ₂ /AuNPs/ADN	0.1-10	0.1	FET	78
GFET-aptámero	0.1-100	0.04	FET	89
Electrodo recubierto de AuNPs/TMT	16 – 2000	5.3	VRA	76
Electrodo de GO/PVP/Cys	100-600	100	VRA onda cuadrada	70
AuNPs-cisteamina-Ru(byp) ₃ ²⁺	0.05-100	0.05	EQL	81

DPV: voltamperometría diferencial de pulso; EQL: electroquimioluminiscencia; FET: transistor de efecto de campo; GFET: transistor de efecto de campo de grafeno; VRA: voltamperometría de redisolución anódica; GO: óxido de grafeno; cys: cisteína; GSH: glutatión; HRP: peroxidasa de rábano picante; BMNPs: nanopartículas bimagnéticas; FC: ferroceno; PVP: polivinilpirrolidona; SPCE: electrodo de carbono serigrafiado; GCE: electrodo cristalino de carbono, TMT: trimercaptotriazina; Ru(byp)₃²⁺: complejo de tris-(2,2-bipiridina)rutenio (II), CS: citrate-stabilized: estabilizadas por citrato

Como conclusión, conociendo que según la OMS la concentración de Hg en agua potable admisible es de 1 ppb (=5 nM), se puede afirmar que los biosensores electroquímicos son capaces de realizar mediciones precisas para estos valores. Incluso detectar valores de concentración menores, lo que se ve reflejado en los ejemplos que se brindan.

La gran mayoría de los biosensores electroquímicos resumidos en este apartado son empleados para la detección de Hg²⁺ en muestras de agua mientras que no es común la utilización de estos para mediciones en muestras de fluidos biológicos. Si se analizan los resultados obtenidos por biosensores electroquímicos en la detección de Hg, es claro que el empleo de AuNPs brinda un incremento en la sensibilidad de estos biosensores dado por la posibilidad de inmovilización de diversos bioreceptores y que favorece la transferencia de carga eléctrica.

Por mencionar ejemplos, cuando se utiliza amperometría como técnica electroquímica, se tiene un electrodo de carbono serigrafiado (SPCE) donde en un caso se recubre con AuNPs, y además se hace selectivo recubriendo el oro con ureasa. En otro caso se emplea el mismo electrodo, pero solo con la

ureasa y sin las AuNPs, el resultado es que en el primero el límite de detección es de 56 nM, mientras que en el segundo solo de 4200 nM. Aun así el electrodo de Pt/Ce/ureasa muestra un límite de detección más bajo que ambos (18 nM).

Una combinación sumamente llamativa es el empleo de la electroquimioluminiscencia; el ejemplo de este biosensor mostrado [AuNPs-cisteamina-Ru(byp)₃²⁺] posee un límite de detección de 0.05 nM, y un rango de detección lineal de 0.05-100 nM. Este biosensor presenta los mismos registros que el basado en el electrodo de Au/cys/GSH-Au NPs/DNA, que emplea voltamperometría para la detección. La diferencia radica en que se utiliza un electrodo sin modificar. Se tienen AuNPs y cuentas magnéticas recubiertas con cadenas complementarias de ADN que, en presencia de Hg²⁺ en una muestra de agua, se entrecruzan; luego se extrae por separación magnética la sonda y se dispone en presencia del electrodo necesario para la medición. Las AuNPs, además, están recubiertas con cisteamina-Ru (byp)₃²⁺, de modo que se mida la señal de electroquimioluminiscencia como se ha discutido previamente en este apartado. Esta es una variante novedosa de combinación electroquímico-óptica en un biosensor.

Para el caso de los transistores de efecto de campo, el ejemplo que utiliza AuNPs/MoS₂-ADN posee un buen límite de detección, (0.1 nM), no obstante es superado aún por el otro FET donde se emplea un aptámero rico en timina con mayor sensibilidad. Para este caso el límite de detección obtenido es de 0.04 nM influido por tener un aptámero diseñado para ser rico en timina, causa de la mayor sensibilidad del biosensor. Otros biosensores con buenos resultados son los que emplean voltamperometría diferencial de pulso (DPV), demostrando una vez más como la combinación AuNPs + recubrimiento selectivo puede reportar valores de límite de detección de 0.05 y 0.005 nM. En estos casos se tiene el electrodo con las AuNPs y biomoléculas como glutatión, cisteína, algún aptámero o como se muestra, todas simultáneamente. Esto permite concluir que la hipótesis sobre la influencia en un mejor desempeño analítico del biosensor al emplear compuestos con grupos tiol y nanopartículas es correcta.

El mejor resultado se da en la combinación de nanopartículas bimetálicas recubiertas con cisteína. Este es el caso del empleo de un electrodo cristalino de carbono recubierto con nanopartículas bimetálicas de Au y Ag. La cisteína en este biosensor juega un papel importante tanto como agente de recubrimiento como en la formación de las nanopartículas, de modo que estaríamos en presencia de un ejemplo de síntesis verde. A su vez se utiliza para enlazar las nanopartículas bimetálicas al electrodo y sirve para incrementar la selectividad por el analito al ser afín a enlazarse al Hg. Este biosensor muestra un límite de detección de 0.0005 nM, y un rango lineal de detección de 0.005-95 nM.

Capítulo 4: Biosensores ópticos para la detección de Hg.

4.1-Biosensores Ópticos. Generalidades.

Cuando la luz interactúa con la materia pueden darse varios fenómenos ópticos en función de las propiedades y características del material expuesto y de la propia radiación incidente. Según la IUPAC, los biosensores ópticos pueden clasificarse en sensores de absorbancia, reflectancia, fluorescencia, luminiscencia, índice de refracción, dispersión de la luz y optotérmicos. Estos biosensores brindan rápida detección, alta sensibilidad, posibilidad de miniaturización y monitorización de la muestra en tiempo real. Además, no necesitan de consumo de tiempo en la preparación previa del dispositivo sensor o preparación de muestra. En ellos se explota la existencia de alteraciones en las propiedades ópticas como las mencionadas, de modo que puedan correlacionarse con el analito a medir⁴⁵. Según la transducción de la señal se pueden describir distintos diseños del biosensor. A modo general se cuenta con una fuente de luz, una estructura que sirve de guía de la radiación luminosa y su consecuente detector. Básicamente nos encontramos con un diseño semejante al de un espectrofotómetro. La luz se dispone por el dispositivo de guía de la radiación. La interacción de la muestra con el biosensor termina provocando cambios en la radiación electromagnética registrada en el detector, que se ve alterada en comparación con la captada en ausencia de la muestra a analizar. Una idea de cómo puede estar dispuesto un biosensor óptico y los sistemas de transducción más comunes se muestran en la Figura 5.

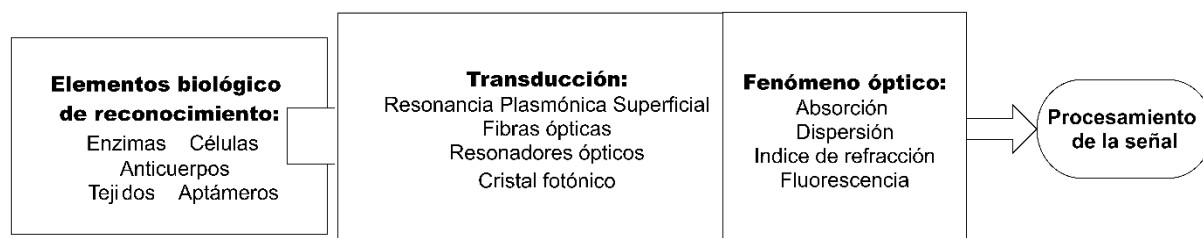


Figura 5: Funcionamiento de un biosensor óptico

A continuación se realiza un breve resumen de las características de los sensores ópticos en función de la interacción de la luz con la materia. A medida que se mencionan estos biosensores se comentan algunos ejemplos de su aplicación en la detección de Hg, problema central de este trabajo.

4.2-Fenómenos físicos en los que se basan los biosensores ópticos.

4.2.1-Sensores de luminiscencia:

Basados en la medición de la intensidad de la luz emitida por el analito. Este tipo de sensores se pueden dividir realmente en dos subcategorías. Si la emisión de luz es producto de absorción de radiación luminosa directamente, se tiene fotoluminiscencia. Esto sucede en los biosensores basados en fluorescencia o fosforescencia. Si la energía se obtiene mediante una reacción química, se tendría quimioluminiscencia y sería otra subcategoría de biosensor⁹⁰.

- Los sensores de fluorescencia se basan en que la interacción con el analito puede producir una atenuación o un incremento de la fluorescencia del indicador. Para la detección de Hg se emplean, por lo general, indicadores fluorescentes como la rodamina B (RB). Para el caso específico que se discute, se han diseñado biosensores que utilizan AuNPs, en cuya superficie se inmovilizan compuestos como homocisteína o ácido mercaptosuccínico junto a la RB. Dichos compuestos con grupos tiol pueden enlazarse fácilmente a las nanopartículas y facilitar la quelatación del Hg. Una vez que el Hg se deposita en la superficie de las nanopartículas, las moléculas de RB se desplazan de estas. La RB es conocida por ver atenuada su fluorescencia cuando recubre AuNPs: al desplazarse de ellas por el Hg mostrará un incremento de emisión de su señal de fluorescencia que se relaciona con la concentración de analito captado por el biosensor^{91,92}.

4.2.2-Sensor de absorbancia:

Basado en la medición de la absorbancia del analito o de la absorción de longitudes de onda específicas después de la interacción analito-receptor. Van a fundamentarse por la aplicación de la Ley de Lambert-Beer. Como se conoce, la absorbancia depende de la concentración de la muestra absorbente que interfiere con el paso óptico de la luz por un medio.

- En el caso de detección de Hg se han diseñado biosensores donde se mide la longitud de onda del pico de la banda de absorción de la luz de AuNPs. Para ello se recubren las nanopartículas con receptores afines al Hg; un ejemplo, la cisteína. Ante la presencia de iones de Hg(II) la cisteína en la superficie de las AuNPs se enlaza a este. La interacción analito-receptor conduce a la aglomeración de las AuNPs. En consecuencia, la longitud de onda absorbida se modifica junto a la banda de resonancia plasmónica de las mismas⁹³. Una variante interesante es aprovechar la morfología de las nanopartículas para medir cómo la deposición y aglomeración del analito modifican la absorción de la luz en el sensor. En este sentido se han sintetizado nanopartículas de oro en forma de estrella, que se funcionalizan con ácido ascórbico. La función del ácido ascórbico es facilitar la reducción del Hg(II) a Hg elemental que presenta mayor facilidad de amalgamación con el oro. Se determina la concentración del Hg a partir de la correlación de esta con el cambio en la banda de absorción de la luz del biosensor, antes y después de la interacción con el analito⁹⁴.

4.2.3-Sensor de índice de refracción:

La medición se centra en el cambio en el índice de refracción. El índice de refracción de un medio es una medida para saber cuánto se reduce la velocidad de la luz dentro del medio. La interacción analito-receptor biológico produce una modificación de este parámetro. Dentro de este tipo de sensores se incluyen los sensores basados en el fenómeno de resonancia plasmónica superficial.

- En la detección de Hg se emplean fibras ópticas recubiertas con biomoléculas y, en ocasiones, con AuNPs. En este último caso se aprovecha la facilidad de amalgamación del oro con el Hg. Simplemente se emplean AuNPs como recubrimiento y, ante el cambio en su índice de refracción, se

puede medir la variación en la intensidad de la luz guiada por la fibra óptica o de la radiación de campo evanescente⁹⁵. Aquellas se encuentran depositadas en una bicapa compuesta por una disolución policationica y una disolución polianiónica, por ejemplo una bicapa de ácido poliacrílico y poli-hidrocloreuro de alilamina. La capa se puede depositar en arreglos de hasta 6 bicapas que ocupan la zona en la que estaría el revestimiento de la fibra. Al interactuar las AuNPs con el Hg se cuantifica el mismo a partir de la señal óptica modificada. En este diseño se han logrado obtener límites de detección de Hg de hasta 0.7 ppb, valor que se encuentra por debajo del límite estándar requerido en agua potable por la OMS⁹⁵.

4.2.4-Sensor de dispersión de la luz:

En estos sensores se mide la dispersión de la luz y su modificación en función del tamaño de las partículas de la muestra que interactúa con el receptor.

-Para la detección de Hg, las AuNPs también se emplean, por sus versátiles características, en la construcción de biosensores ópticos. En concreto, se recubren las nanopartículas con secuencias de ADN ricas en timina, por ser esta base nitrogenada muy afín a formar enlaces con el Hg(II). Ejemplo de un biosensor con estas características es el que emplea secuencias de oligonucleótidos como la 5'-GTTCTTTGTCTTCA-3' y la secuencia 5'-TGCAGCCGACGCAC-3'. Al recubrir las nanopartículas, evitan su aglomeración. En un experimento realizado, se mide la dispersión de la luz a una longitud de onda de 668 nm, en presencia de NaNO₃. De adicionarse Hg(II) a la suspensión coloidal de nanopartículas, se desplazan las cadenas de oligonucleótidos de la superficie de las mismas, por lo que se aglomeran y se modifica el espectro de dispersión de luz registrado⁹⁶.

4.2.5-Resonancia plasmónica superficial:

El fenómeno de resonancia plasmónica superficial debe entenderse como un proceso de interacción colectiva de los electrones en la banda de conducción de las nanopartículas, con la radiación electromagnética. Siempre que el fotón de luz incidente tenga una frecuencia, que esté en resonancia con la frecuencia de oscilación de los electrones en la banda de conducción, estaremos en presencia de este fenómeno óptico. En el caso concreto de las AuNPs, los electrones 6S de su banda de conducción se ven involucrados en la oscilación coherente⁴⁰. Está descrito que este tipo de proceso se vuelve dominante para dimensiones menores a los 100 nm. Incluso se conoce que la interacción con la radiación luminosa tendrá mayor eficiencia cuando la separación entre cada nanopartícula sea 2.5 veces menor que el diámetro de las mismas^{97,98}. Ante una agregación de éstas, los modos en que oscila el plasmón comienzan a solaparse, lo que trae un ensanchamiento en el pico de absorción de la luz. A medida que la agregación prosigue, incluso se desplaza el pico de absorción.

Este fenómeno produce una fuerte absorción de la radiación. La longitud de onda a la que ocurre, depende de múltiples factores como el tamaño, estado de agregación, forma y fortaleza de interacción

entre las partículas del material⁹⁵. Por ello, se puede emplear este fenómeno para el diseño de dispositivos ópticos biosensores.

4.3-Biosensores óptico-colorimétricos para la detección de Hg basados en cisteína y nanopartículas de oro.

Las AuNPs, como se ha mostrado con más de un ejemplo, se pueden emplear para la confección de biosensores de tipo electroquímico u óptico. No obstante, su empleo prima en el diseño de biosensores y sensores óptico-colorimétricos (ver Anexo 3). Las AuNPs muestran cambios significativos en la coloración de su dispersión coloidal ante variaciones de su morfología, tamaño, agregación o distancia entre una partícula y otra⁹⁹. Los biosensores colorimétricos basados en AuNPs se rigen por distintas estrategias de funcionamiento mediante las cuales, ante la interacción bioreceptor-analito, se inducirá una alteración de la resonancia plasmónica superficial.

Dentro de estas estrategias para la detección de Hg se emplea comúnmente la basada en agregación de las nanopartículas, donde las mismas pueden estar recubiertas con un ligando receptor del analito o no. Para el caso de poseer un elemento de reconocimiento en su superficie, se distinguen tres variantes: agregación inducida por entrecruzamiento, sin entrecruzamiento y por desestabilización. El último caso mencionado se centra en que el ligando empleado como recubrimiento, es más afín a formar enlaces con el analito que con las propias AuNPs. En presencia de una concentración suficiente de analito, este desplazará el recubrimiento de modo que se pierde la repulsión estérica entre cada nanopartícula y se induce su agregación con el cambio de coloración esperado. Dicha variante se asemeja a la situación de tener AuNPs sin recubrimiento: el analito puede ser capaz de modificar la repulsión electrostática que mantiene la estabilidad de la dispersión coloidal e inducir su agregación. Para la agregación inducida por entrecruzamiento, el ligando que recubre las nanopartículas (péptidos, aminoácidos, aptámeros) posee en su extremo libre un grupo capaz de interactuar con el analito mediante fuerzas de Van der Waals, enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas, formación de enlaces covalentes e interacciones hidrofóbicas, entre otras¹⁰⁰. Esto provoca un entrecruzamiento de los ligandos dispuestos superficialmente en las AuNPs que conlleva a su agregación. En la Figura 6, se muestran ejemplos de este tipo de biosensores.

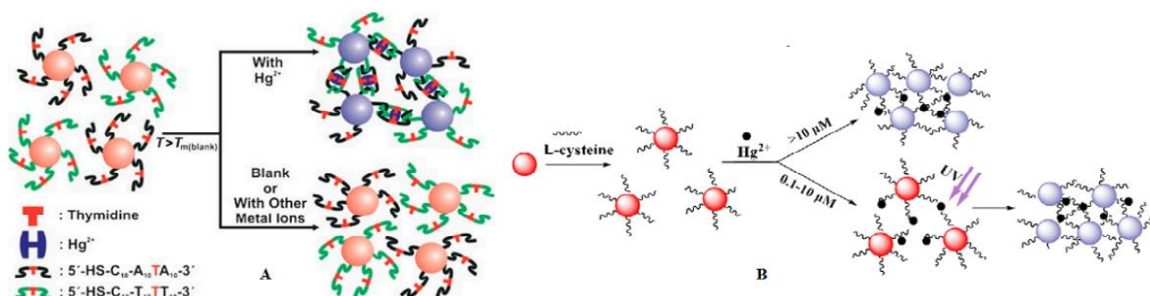


Figura 6: Mecanismo de acción de un biosensor colorimétrico basado en AuNPs y su agregación por entrecruzamiento. A: según Ref¹⁰⁰, y B: según Ref⁹³.

Por otro lado, la variante de agregación inducida sin entrecruzamiento se observó inicialmente en AuNPs recubiertas con cadenas simples de ADN en el año 2003, por Mizuo Maeda y su grupo¹⁰¹. Estas cadenas evitan la agregación de las nanopartículas al generar repulsión electrostática y estérica que mantiene estable la dispersión coloidal. En presencia de la cadena complementaria a la cadena de ADN empleada como recubrimiento, se observa una rápida agregación, pero que ocurre sin entrecruzamiento. Curiosamente si una de las bases nitrogenadas en la secuencia no es la complementaria correcta, tampoco ocurre aglomeración de la suspensión coloidal. Este factor se emplea en la detección de Hg al ser capaz de completar la falta de complementariedad entre dos cadenas enlazándose simultáneamente a la timina. En la Figura 7, se ilustran ejemplos de biosensores colorimétricos con agregación sin entrecruzamiento.

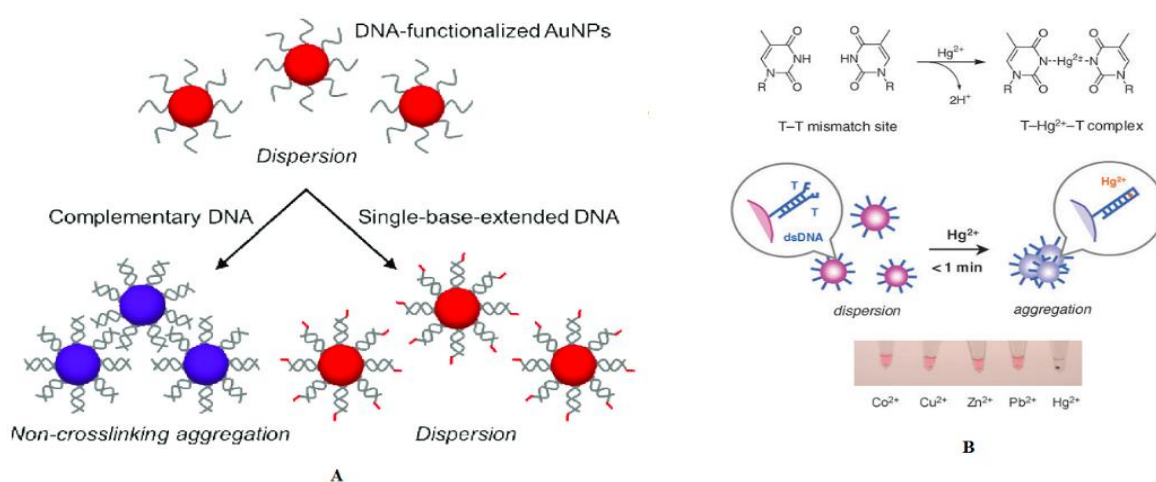


Figura 7: Ejemplos de agregación inducida sin entrecruzamiento en AuNPs. A: Según Ref.¹⁰² B: Según Ref.¹⁰³.

También está la opción de emplear antiagregación; en este caso, se favorece el entrecruzamiento entre las moléculas del recubrimiento de una nanopartícula con otra. El cambio de coloración se produce cuando el analito se enlaza preferentemente con el recubrimiento y elimina el entrecruzamiento, restaurándose el color de las AuNPs al del estado no agregado. Otros biosensores colorimétricos basados en AuNPs se fundamentan en su capacidad de mimetizar la actividad de algunas enzimas, y reacciones en las que se forman productos que emiten radiación luminosa visible¹⁰⁴. Incluso se ha empleado la influencia de algunos analitos en el crecimiento, formación y morfología de las nanopartículas¹⁰⁵. La variación de estos aspectos por la presencia del compuesto a medir produce cambios en la resonancia plasmónica superficial de las nanopartículas, lo que permite hacer un cálculo de la concentración del elemento a medir.

Una vez analizados algunos de los esquemas para formar un biosensor óptico se pasa a revisar varios ejemplos de biosensores colorimétricos. Más precisamente, se discuten trabajos realizados con biosensores, donde biomoléculas sulfuradas sirven de elemento de bioreconocimiento de Hg. De ellas cabe destacar la L-cisteína. No obstante, se pueden encontrar enzimas o polipéptidos como la ya

mencionada ureasa, glutatión y metalotioeninas, respectivamente. La ventaja de emplear aminoácidos es que son moléculas más simples, menos costosas y que generan menor complejidad a la hora de construir un biosensor. Por ello, comparados con oligonucleótidos o enzimas, se muestran más prácticos.

4.3.1 Biosensor de absorción basado en AuNPs funcionalizadas con L-cisteína y compuestos similares.

La idea principal del biosensor es poder detectar a simple vista un cambio de coloración que se corresponda con la presencia de mercurio en agua. El cambio colorimétrico se sigue mediante un espectrofotómetro UV-visible.

Para la obtención de un ejemplo de esta variante de biosensor se han sintetizado nanopartículas de oro de 16 nm, empleando la síntesis de Turkevich⁹³. Posteriormente se funcionalizan con L-cisteína en base a la afinidad de los grupos tiol del aminoácido por el oro. El fundamento del biosensor es el desplazamiento del pico de absorbancia del plasmón de las AuNPs al quelatar la L-cisteína los iones de mercurio presentes en agua. Producto de ello se origina una aglomeración de las AuNPs-Cys que se evidencia con cambios en la coloración de la disolución coloidal de nanopartículas. Las nanopartículas recubiertas con L-cisteína (AuNPs-Cys) mostraron un pico de absorbancia del plasmón de resonancia superficial a 518 nm. La sensibilidad, selectividad y tiempo necesario para generar señal óptica del sensor se estudió en profundidad. Se emplearon disoluciones de Hg^{2+} en un rango de concentraciones de 5-50 μM , obteniéndose como resultado que para los intervalos de 8-15 μM el cambio de coloración se nota, pero tras un tiempo de 30 minutos, y para concentraciones de 20 μM , el cambio es instantáneo. No obstante, se concluyó que el mínimo de concentración detectable a simple vista sería de 15 μM . Esto se considera así debido a que para otras concentraciones el cambio producido puede no ser tan evidente.

La sensibilidad del sensor se determinó empleando la espectrofotometría-UV. Se probaron muestras de Hg^{2+} en un rango de concentración de 0.01-15 μM , el cambio en la absorbancia a 518 nm y el incremento de la absorbancia a una longitud de onda de 650 nm; a medida que se incrementa la concentración de mercurio, la medida a esta segunda longitud de onda es una prueba de cómo influye la concentración de aquél en el desplazamiento del plasmón de resonancia de las AuNPs-Cys. La medición se repitió a los 5 minutos posteriores y se observó como resultado que someter el sistema a la radiación UV induce a la aglomeración más rápido para concentraciones en las que no se había producido. Según los resultados que presentan los autores, la concentración mínima detectable tras la aplicación de radiación UV sería de 100 nM de Hg^{2+} , lo que representa una mejora significativa con respecto al experimento sin radiación UV.

De similar funcionamiento a este biosensor, pero empleando dietilditiocarbamato (DDTC)²⁹, se han obtenido resultados muy precisos. En este caso, incluso se logra la discriminación entre Hg(II) y MeHg, con la ayuda de AEDT. Las AuNPs se sintetizaron de forma convencional empleando el método de Turkevich. Estas quedan estabilizadas por los iones citrato en su superficie y no sufren agregación ante la presencia de un complejo de Cu²⁺-bis-DDTC. De encontrarse Hg en el medio (cualquiera de las dos especies mencionadas, Hg(II) y MeHg), se romperá el complejo Cu²⁺ con el DDTC, lo que provoca que uno de los grupos tiol del DDTC se una al Hg y el otro a las AuNPs. Esto conlleva a una agregación de las nanopartículas y el consiguiente cambio de coloración de su dispersión coloidal. El experimento se puede realizar en presencia de AEDT, que acomplejará al Hg(II), de modo que el cambio detectado de coloración se correlaciona solo con el MeHg. Las concentraciones detectadas fueron de 10 nM y 15 nM para el Hg (II) y el MeHg, respectivamente. En este caso el resultado obtenido es mejor que para el ejemplo anterior.

Un hecho interesante es que se ha descrito que, una vez se deposita Hg⁰ sobre las AuNPs, estas muestran actividad similar a las peroxidasas¹⁰⁴. Cadenas de ADN selectivas para el MeHg sirven para captar el analito y, por acción de NaBH₄, reducirlo. Ello conlleva que se deposite Hg en las AuNPs y se forme una amalgama con actividad de peroxidasa. La actividad mimética que presenta esta amalgama es única y no se presenta en otras amalgamas de oro con otros metales, al menos no con una actividad tan alta. En presencia de H₂O₂ y tetrametilbenzidina (TBM), se favorece la oxidación del colorante TBM, adquiriendo la suspensión coloidal una coloración azul. La medición por espectrofotometría UV-visible ha permitido determinar límites de concentración de Hg de 5 nM con un rango lineal de detección de 10-200 nM¹⁰⁶.

4.3.2-Biosensor para determinación de Hg basado en antiagregación de AuNPs funcionalizadas con L-cisteína y compuestos similares.

Los biosensores colorimétricos basados en antiagregación se centran en el empleo de compuestos que recubren superficialmente las nanopartículas. Estos ligandos no solo se enlazan a las nanopartículas, sino que forman enlaces entre ellos mismos y se entrecruzan. Ello induce una agregación de las nanopartículas. En el caso de nanopartículas que posean el fenómeno de resonancia plasmónica superficial verán modificada su espectro de absorción con su tamaño y agregación. Ello conlleva a que se genere un cambio de coloración en su dispersión coloidal. En presencia de un analito de interés, que presente mayor afinidad por el recubrimiento superficial de las nanopartículas, se puede revertir la agregación de las mismas, lo que se observa con la inversión del cambio de coloración presenciado inicialmente⁴⁰.

Como ejemplo de este tipo de biosensor se pueden sintetizar AuNPs empleando cloruro de poli-dialildimetilamonio (PDDA)¹⁰⁷. Este reactivo se emplea como agente reductor y como estabilizador de la suspensión coloidal que se obtiene. Las nanopartículas quedan con una carga superficial

positiva. Ante la presencia de cisteína, se provoca una aglomeración de las mismas. Ello se evidencia en el cambio de coloración de rojo vino a violeta que sufren. Ello ocurre al enlazarse el aminoácido por la interacción de su grupo tiol con el núcleo de oro de las nanopartículas, y por la interacción entre los grupos carboxilo y amino que se da entre el aminoácido dispuesto en la superficie de cada nanopartícula.

El fundamento de este biosensor es la mayor afinidad del Hg(II) por formar enlaces con los grupos tiol de la cisteína, con respecto a las AuNPs. En el caso de este biosensor, a diferencia del discutido anteriormente en la sección (4.5.1), lo que se busca es el cambio de coloración opuesto y la consiguiente desagregación de las AuNPs. Las mismas fueron analizadas por espectrofotometría UV-visible. El pico de su banda de absorción se encontró en los 517nm de longitud de onda. Ante la presencia de cisteína (7 µg/ml) en la cantidad adecuada con respecto a la concentración de la suspensión coloidal de AuNPs, se provocó su agregación con un desplazamiento de la banda de absorción a 545 nm. En base a las condiciones del experimento, se detectó que para una concentración de Hg(II) de 1×10^{-5} M o superior, se produce un cambio reversible en el estado de agregación de las AuNPs. Esto es debido al enlace preferente del Hg (II) a la cisteína y a su posterior desplazamiento de la superficie de las nanopartículas.

Con semejanza a este tipo de biosensor colorimétrico basado en antiagregación de nanopartículas, se han empleado compuestos que en uno de los extremos de su cadena carbonada poseen un grupo tiol para enlazar a las AuNPs y en el otro un grupo amino cuaternario¹⁰⁸. En este caso, el sensor tiene el mismo principio de funcionamiento que el descrito basado en AuNPs-PDDA. El Hg(II) tendrá mayor afinidad por formar enlace con el grupo tiol, que el oro. Ello trae que las AuNPs que están agregadas, en presencia del analito, pierdan el ligando que las recubre y la antiagregación generada se manifieste en un cambio de coloración de violeta a rojo vino. El límite de detección obtenido en este dispositivo fue de 30 nM. Igual que en los dos casos discutidos antes, un sensor óptico-colorimétrico basado en AuNPs funcionalizadas con aminopropiltriethoxisilano (APTES)⁶³, se ha construido fundamentado en la antiagregación de nanopartículas. Las AuNPs funcionalizadas con APTES presentan una suspensión coloidal azul. El desplazamiento de APTES, producto por el Hg(II) al formar una amalgama con el oro, conlleva la deposición de Hg en la superficie de las AuNPs y tiene un efecto antiagregante. Por ello, se da un cambio de coloración de azul-púrpura-rojo. En este sensor se obtuvo un límite de detección de 10 nM y un rango lineal de detección entre 0-92.3 nM.

4.3.3- Biosensor fluorescente basado en AuNPs recubiertas con cisteína.

En este ejemplo, se aprovecha la ventaja de que las AuNPs-cisteína presentan fluorescencia¹⁰⁹, con un pico de absorción y emisión de 373 nm y 625 nm, respectivamente. El funcionamiento del biosensor tiene como fundamento que en presencia de Hg(II), este interactúa con la cisteína por su grupo carboxilo y con el oro. Esta interacción produce un ‘quenching’ (decaimiento) de la fluorescencia. El

biosensor muestra selectividad al no ocurrir ‘quenching’ en presencia de otros iones; a su vez, el límite de detección medido fue de 1.3 nM y el rango lineal de detección fue de 2 nM-30µM. Ante la absorción de radiación de 373 nm se tiene una fluorescencia donde la luz emitida es de color rojo. Una vez interactúan con el Hg y se da el ‘quenching’, la coloración desaparece. En la Tabla 5 se brindan más ejemplos de biosensores para la detección de Hg.

Tabla 5: Biosensores ópticos para la detección de Hg.

<i>Biosensor o sensor óptico</i>	<i>Método empleado</i>	<i>LD / nM</i>	<i>RDL / nM</i>	<i>Ref</i>
AuNPs-MPA/PDCA	Colorimetría(Agregación)	100	-	92
AuNPs-homocisteína-MPA	Colorimetría(Agregación)	25	-	92
AuNPs-QUAT	Colorimetría(Agregación)	30	30-20x10 ⁶	108
AuNPs-Cys	Colorimetría(Agregación)	100	-	93
AuNPs-Cu(DDTC) ₂	Colorimetría(Agregación)	10	10 – 1500	29
AuNPs-DDTC(AEDT)*	Colorimetría(Agregación)	15	26–1300	29
Papaína-PDCA-AuNPs	Colorimetría(Agregación)	9	10-14000	110
AuNPs/o-OPD	Colorimetría(Antiagregación)	5	10 - 2000	111
AuNPS/PDD-Cys	Colorimetría(Antiagregación)	25	0.5 - 1000	107
AuNPs-APTES	Colorimetría(Antiagregación)	10	0 – 92.3	63
AuNPs-Lys-DTT	Colorimetría(Agregación)	0.058	-	112
PDCA/RB-AuNPs-MPA	Fluorescencia (turn-on)	10	-	113
AuNPS-Cys	Fluorescencia (turn-off)	1.3	2 - 30000	109
AuNPs-ADN-Ps-ARN/EXO III	Colorimetría(Agregación)	1.3	2 – 100	114
AuNPs-ADN	Colorimetría(Agregación)	3.4	5-100000	115
Au(nano-estrellas)-ácido ascórbico	Modificación de morfología (absorbancia)	0.24	1 - 4000	94
AuNPs-PHA/PAA	Fibra óptica	3.5		95
AuNPs-aptámero-grupo fluoróforo	Fluorescencia (turn on)	0.121		116

LD: Límite de detección; RDL: Rango dinámico lineal; MPA: ácido mercaptopropiónico; PDCA: ácido dipicolínico; o-OPD: orto-fenilendiamina; RB: rodamina B; Cys: cisteína ; PDDA: cloruro de polidimetildialilamonio; QUAT: 11-(mercapto-undecil)-trimetilamonio; DDTC: dietilditiocarbamato; Lys: lisina; DTT: ditiotreitól; Ps: fosforotioato; EXO III: exonucleasa III; PHA: poli-hidrocloruro de alilamina ; PAA: ácido poliacrílico; AuNPs-DDTC(AEDT)*: este caso se resalta porque se emplea para MeHg a diferencia del resto.

Se puede concluir que los biosensores óptico-colorimétricos pueden ser útiles en la detección de Hg para valores inferiores a los 5 nM, límite en agua potable según la OMS. De 16 biosensores recogidos como ejemplo en la Tabla 5, 8 poseen un límite de detección de Hg menor o igual que 5 nM. Para el límite permitido por la EPA (10 nM) se tendrán hasta 11 biosensores que satisfacen el límite permitido. No obstante, estos están diseñados en su mayoría para realizar análisis en laboratorio

Uno de los mejores resultados en cuanto a detección de muestra (0.24 nM), es el del biosensor de absorbancia basado en la formación de la amalgama Au-Hg, en las nanoestrellas de Au. No obstante,

su diseño no permite que sea portable al requerirse un espectrofotómetro UV-visible. Algo semejante pasa con los biosensores de fibra óptica. En este ejemplo concreto, la fibra óptica con recubrimiento de AuNPs-PHA/PAA tiene un límite de detección de 3.5 nM, y según se reporta en el artículo analizado, el tiempo de medición solo toma 8 minutos. Es, además, reutilizable, dado que se plantea la regeneración del mismo tras tratamiento de 1 hora con HNO₃. Este sensor, podría combinarse con algunas de las biomoléculas utilizadas. Además de ser miniaturizable, ganaría en portabilidad y versatilidad. En estos casos se debe valorar entonces la prioridad de poder medir in situ el analito o con más sensibilidad y precisión.

Los dos biosensores anteriores, con respecto a la mayoría de los sensores que se basan en agregación, presentan superioridad a la hora de detectar bajas concentraciones de Hg. La ventaja que sí poseen los biosensores de agregación o antiagregación es que pueden utilizarse sin requerimiento de equipamiento auxiliar. Es decir, que con tener la suspensión coloidal de AuNPs, con su recubrimiento selectivo por el analito, la respuesta a la presencia de Hg se evidencia por cambios de coloración sensibles a la vista del ojo humano. Como conclusión se puede decir que su portabilidad los hace más versátiles. De perfeccionar estos biosensores se pueden tener test simples para el análisis in situ en el propio lugar donde se encuentre la muestra. Esto evita que la muestra sufra alteración o cambios desde que se recolecta hasta que se realiza la medición. Para ello, se tienen valores de límite de detección desde 100 nM hasta 58 pM. Este último caso (58 pM), es el que mejor resultado muestra no solo para biosensor colorimétrico de agregación/antiagregación, sino también con respecto al equipamiento que requiere. En este biosensor, según el artículo analizado, se logra la aparición de señal analítica en unos 15 minutos. Se debe emplear NaBH₄ en la muestra de agua a estudiar para reducir el Hg²⁺ a Hg⁰. Una vez en este estado, el Hg se amalgama con las AuNPs que, en presencia de lisina y ditioeritritol, cambian de coloración, en este caso, de rojo a azul a incoloro. De criticarse algo de este biosensor sería que se necesita un paso previo de reducción de la muestra; no obstante, a pesar de este pretratamiento, es más portable que los sensores que requieren de un espectrofotómetro y muestra un bajo límite de detección que puede atribuirse al ditioeritritol y sus dos grupos tiol.

El último ejemplo de biosensor mostrado en la Tabla 5, es muy interesante. En este caso, la detección de Hg se realiza en una muestra de fluido sanguíneo. Aquí se busca que el Hg desplace de las AuNPs un aptámero modificado con un grupo fluoróforo. Las AuNPs producen decaimiento de la fluorescencia del aptámero y, una vez este se libera por la presencia de Hg, se mide el incremento de la fluorescencia que se correlaciona con la concentración del analito. Este biosensor ha logrado un límite de detección de 0.121 nM para Hg²⁺, e incluso permite la detección simultánea de Pb²⁺, a pesar de la presencia de especies catiónicas en fluido sanguíneo, que son interferentes en la medición. También posee como ventaja que es lo suficientemente robusto para soportar la acción de nucleasas en fluido sanguíneo, las cuales pueden degradar el aptámero empleado como bioreceptor.

Capítulo 5: Propuesta de biosensor para la detección de Hg

En el presente apartado se describe una propuesta experimental plausible, para el diseño de un biosensor destinado a la detección de Hg; específicamente para Hg^{2+} en muestras de agua y fluido biológico. El biosensor que se propone se basa en AuNPs, las cuales se recubrirán con DMSA y L-cisteína. Este dispositivo se puede clasificar como óptico de tipo colorimétrico. Su mecanismo de funcionamiento se centra en la agregación de las AuNPs. Estas cumplen la función de transductor del biosensor. Por otro lado, la L-cisteína (L-cys) y el DMSA tienen la función de elemento de reconocimiento selectivo del Hg. Con diferencia a otros biosensores mostrados en este trabajo, se trata de garantizar que los grupos tiol del recubrimiento sean los que interactúen con el Hg. En otros biosensores la cisteína se enlaza al oro por su grupo tiol, mientras que quelata al Hg por su grupo carboxilo. Acá se emplea el DMSA como elemento de enlace entre el oro y la cisteína, de modo que este aminoácido tenga sus grupo $-\text{SH}$ libre para interactuar con el analito. Esto podría constituir la clave para tener un biosensor con mayor selectividad y sensibilidad. La configuración inversa de cisteína-DMSA cumple igualmente con este propósito por tanto se propone realizar ensayos con ambas configuraciones. En la Figura 8, se muestra un esquema del biosensor que se pretende diseñar.

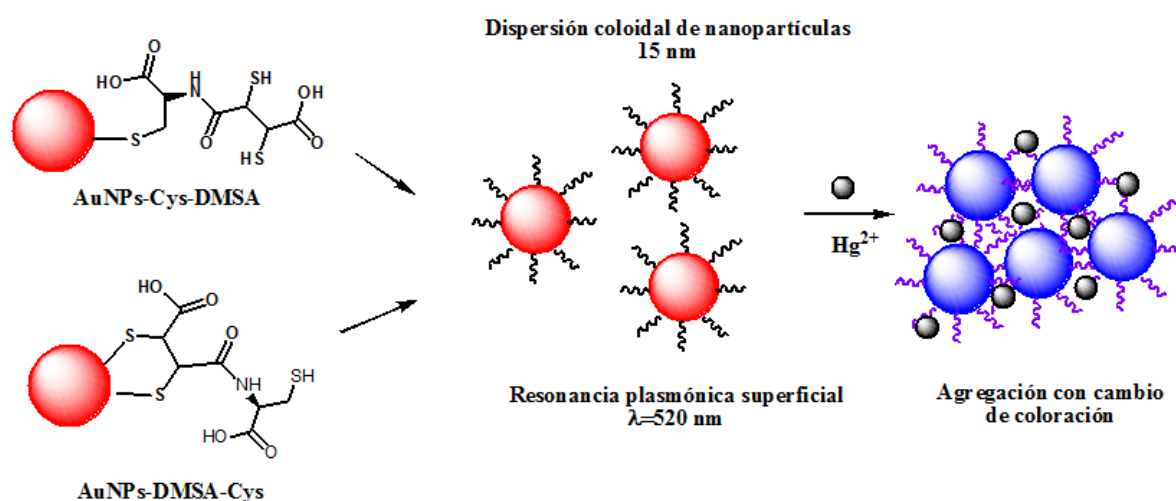


Figura 8: Esquema del biosensor propuesto.

Se proponen las siguientes pautas a seguir:

1. Síntesis de las AuNPs empleando el protocolo diseñado por Turkevich.
2. Recubrimiento de las AuNPs con DMSA o con L-cisteína (Cys).
3. Conjugación de las AuNPs-DMSA con L-cisteína o AuNPs-Cys con DMSA.
4. Ensayo frente a muestras de Hg.
5. Estudio de los parámetros analíticos del biosensor.

Procedimiento a seguir para la síntesis de AuNPs. Síntesis de Turkevich. Según Ref ¹¹⁷

Para la síntesis de las AuNPs se preparan inicialmente dos disoluciones (A y B):

A: Disolución de KAuCl_4 (1.5 mM). Se pesan 14.17 mg de KAuCl_4 y se disuelven en 25 mL de H_2O .

B: Disolución de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ (38.8 mM). Se pesan 250.3 mg de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ y se disuelven en 25 mL de H_2O .

A continuación se toman 20 mL de **A** y se ponen en un Erlenmeyer de 50 mL. Se calienta la disolución hasta ebullición. En este momento, se adicionan 2 mL de **B**. Se mantiene la agitación y el calentamiento. La disolución de **A**, inicialmente de coloración amarillo pálido, al adicionársele **B** comienza a cambiar su color. Pasa de color amarillo a incoloro, luego se vuelve azul y, finalmente, rojo vino. La coloración rojo vino indica la finalización de la formación de las AuNPs. Este es el color característico de las nanopartículas de un tamaño aproximado entre 10-15 nm. En el momento en que ocurre el cambio de coloración indicado, se detiene el calentamiento y se deja enfriar la disolución a temperatura ambiente. La suspensión coloidal se puede caracterizar mediante espectrofotometría UV-visible, dispersión dinámica de luz (DLS) y las técnicas de microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía electrónica de transmisión (TEM). La Figura 9 muestra un diagrama de la síntesis, adaptado de Refs ^{35,39}.

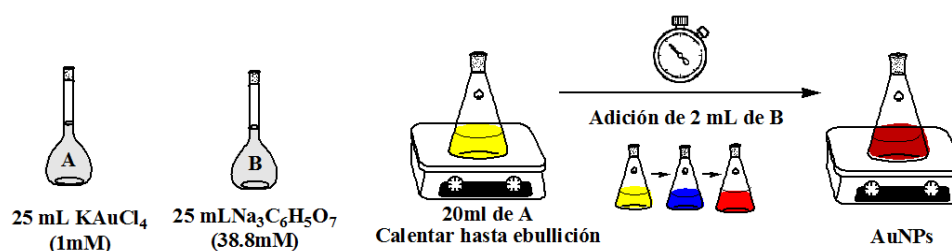


Figura 9: Diagrama representativo del procedimiento de síntesis

Antes de pasar al recubrimiento de las AuNPs con DMSA, se sugiere realizar un estudio para conocer con que parámetros se pueden purificar las AuNPs por centrifugación una vez recubiertas. Este proceso se puede optimizar variando el tiempo de centrifugación y las revoluciones por minuto (RPM) a las que se someten las muestras. El ensayo propuesto se muestra la Tabla 6.

Tabla 6: Experimento para la optimización de la purificación de AuNPs

RPM	A=10 000	B=12 000	C=14 000	A-T1	A-T2	A-T3
Tiempo en minutos	T1	T2	T3	B-T1	B-T2	B-T3
	10	15	20	C-T1	C-T2	C-T3

El procedimiento experimental sería el siguiente: inicialmente, se registra el espectro UV-visible de la suspensión coloidal de AuNPs. Luego, se procede a centrifugar, según el caso, combinando tiempos de T1 a T3 con RPM de A-C y se mide el espectro de absorción del sobrenadante. La combinación de variables que brinde un espectro de absorción del sobrenadante con desaparición de la banda de las AuNPs a 520 nm será la deseada. Esto indica que las AuNPs se han separado de los compuestos en exceso no enlazados a ellas que son solubles en agua. Las nanopartículas se redispersan en H_2O

MilliQ con ayuda de un baño ultrasónico. Se debe buscar un compromiso entre la capacidad del centrifugado para purificar las AuNPs, siempre que no las agregue y dificulte su redispersión posteriormente. Este experimento se ha llevado a cabo mostrando como resultado más equilibrado la combinación B-T2, en cuanto a capacidad de eliminación de residuos, consumo de tiempo y posibilidad de redispersar las nanopartículas en H₂O. En los casos extremos C-T2 y C-T3 se logra la purificación, pero al redispersarse, las AuNPs quedan aglomeradas. En la Figura 10, se muestran los espectros de los sobrenadantes tras cada combinación de RPM-tiempo. Se ve como la absorbancia de la banda de 527-528 nm disminuye en el sobrenadante hasta llegar a un punto en que casi no hay existencia de AuNPs en el mismo, siendo satisfactoria su extracción y purificación.

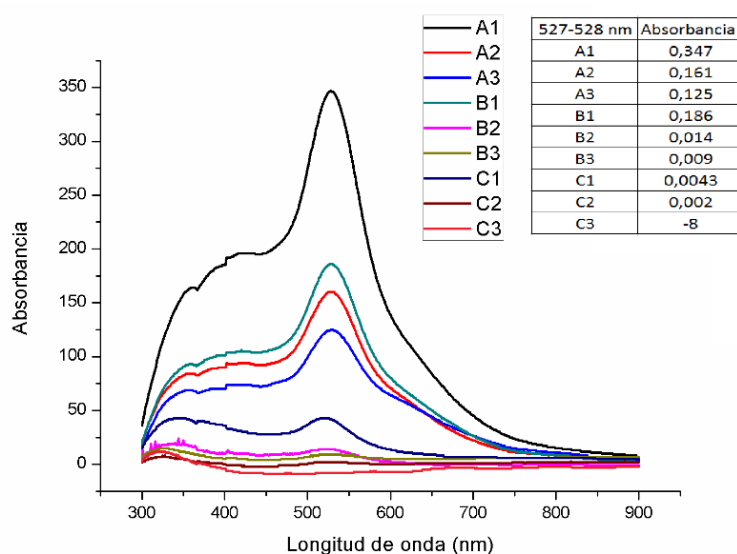


Figura 10: Ejemplo de experimento de optimización de la purificación de AuNPs por centrifugación.

Recubrimiento de las AuNPs con DMSA

Para el recubrimiento de las AuNPs se realiza un intercambio de ligandos entre el citrato que las recubre y el DMSA, a temperatura ambiente y durante 24 horas. El DMSA, debido a su mayor afinidad por el oro desplaza el citrato, que se disuelve en el agua de la suspensión coloidal. A continuación se puede realizar un experimento para determinar con que concentración de reactivo las AuNPs quedan recubiertas y no se agregan. Ello se puede seguir mediante espectrofotometría UV-visible, censando si existe cambio en la banda de resonancia plasmónica del Au, posterior a la adición de diferentes concentraciones del ligando en cuestión. Se toma 1 mL de AuNPs (1.5 mM) y se le adiciona 1 mL de disolución de DMSA con las siguientes alícuotas. La Tabla 7 muestra un posible diseño de este experimento cuyos resultados se ilustran en la Figura 11. Al pasar de la muestra A a la F se adiciona una cantidad decreciente de DMSA, como se ve por la proporción molar DMSA/AuNPs.

Tabla 7: Análisis de la conjugación de AuNPs con DMSA

<i>Muestra de AuNPs (1.5 mM)</i>	<i>DMSA (3 mM)</i>	<i>Proporción molar DMSA/AuNPs</i>	<i>Muestra</i>
1 mL	1mL	2/1	A
1 mL	0.75mL	3/2	B
1 mL	0.625mL	5/4	C
1 mL	0.5mL	1	D
1 mL	0.375mL	3/4	E
1 mL	0.25mL	1/2	F

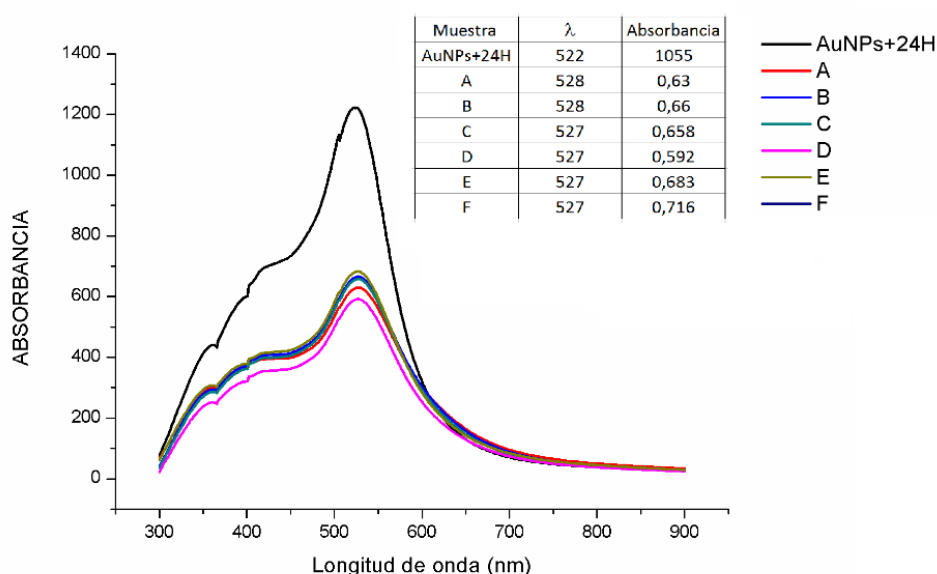


Figura 11: Resultados obtenidos al conjugar AuNPs con DMSA, según la Tabla 5.

De este estudio se puede concluir que las AuNPs no sufren agregación considerable, al variar poco el pico de absorbancia de 522nm, que solo se mueve hasta los 527-528 nm. Por otro lado, es interesante ver que la absorbancia sufre una disminución en dependencia de la cantidad de DMSA adicionado. Esto se puede correlacionar con la cantidad de ligando que recubre las AuNPs para cada caso y que atenúa la absorción de la luz por parte de las mismas. No obstante para cerciorarse de la deposición de DMSA superficial y que el intercambio de ligando es exitoso se debe recurrir a otras técnicas, como la espectroscopía IR. También se sugiere emplear la técnica de dispersión dinámica de luz para observar si existe un incremento en el radio hidrodinámico de las AuNPs después de ser recubiertas con DMSA. Antes de pasar a la conjugación de las AuNPs-DMSA se debe eliminar el exceso de ligando que no recubre las mismas. Para ello se puede emplear centrifugación y lavados con H₂O MilliQ (por triplicado). En este caso se emplea B-T2 (12000 RPM durante 10 minutos) como combinación, según la Tabla 6.

Conjugación con L-cisteína:

Para la conjugación con L-cisteína, se propone emplear la formación de un enlace amida entre los grupos carboxilo del DMSA y el grupo amino terminal del aminoácido. Ello se realiza con un acoplamiento covalente mediado por carbodiimidas. En este caso, se recomienda el uso de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC). Esta carbodiimida es soluble en agua, lo que permite no tener que trabajar en fase orgánica. A su vez, la urea que se genera tras el acople también es soluble en agua. De esta forma se puede repetir el experimento de la Tabla 6 y purificar mediante centrifugación el producto de reacción. Para este tipo de síntesis se recomienda emplear un reactivo inhibidor de racemización del producto. En el caso del EDC se acostumbra a utilizar N-hidroxisuccinimida (NHS). La cantidad de EDC, NHS y L-cisteína debe estar en exceso con respecto a la concentración de AuNPs, siendo recomendable emplear desde 2 a 6 veces esa concentración. Otra opción para purificar las AuNPs-DMSA-Cys es mediante diálisis.

La caracterización del producto de reacción se puede llevar a cabo por medio de espectroscopía IR. De realizarse la síntesis en el orden inverso, (síntesis de AuNPs-Cys-DMSA) se puede también realizar el test de la ninhidrina. Este permite conocer si todos los grupos aminos disponibles para acoplarse con un carboxilo están ya cubiertos o no. De aún no terminar la síntesis, la alícuota de muestra tomada para el mismo tendrá una coloración azul, mientras que de estar todos los grupos acoplados por formación de enlace amida se tiene ausencia de color. Tanto este procedimiento como el de síntesis se detallan esquemáticamente en los apéndices de este trabajo. Ver Anexo 4 y 5.

Otra variante a tener en cuenta en la caracterización del producto de síntesis es la caracterización textural del sistema AuNPs-DMSA-Cys o AuNPs-Cys-DMSA mediante SEM/STEM (SEM en modo barrido/transmisión) y TEM. Con estas técnicas de microscopía se puede analizar la superficie de las nanopartículas e intentar confirmar así la existencia del recubrimiento sobre las mismas. Si se acopla el equipamiento para microscopía con EDS (espectroscopía de dispersión de energía de rayos X) se tendría un análisis elemental de la muestra con el que se puede corroborar la existencia de los grupos tiol del recubrimiento. De complementarse todos los resultados de las técnicas de caracterización utilizadas se tendría entonces el sistema deseado.

Ensayo para detección de Hg.

Como ensayo para la detección de Hg^{2+} y comprobación del correcto funcionamiento del biosensor, se sugiere preparar una serie de disoluciones patrones de Hg^{2+} en agua, partiendo de valores inferiores al límite de detección para este tipo de muestra según la OMS (1 ppb = 5nM de Hg). Se tendrá certeza de su operatividad, si en presencia del analito, las AuNPs-DMSA-Cys (o en orden inverso AuNPs-Cys-DMSA) muestran cambio de coloración de rojo a azul. Se debe tener en cuenta que el ojo humano posee un límite de longitudes de onda capaces de observar. No obstante, puede que ocurra agregación de las nanopartículas y desplazamiento de su pico de resonancia plasmónica solo

perceptible mediante espectrofotometría de absorción UV-visible. El tiempo que demore en cambiar de coloración la dispersión coloidal del biosensor debe registrarse de modo que se conozca su velocidad de operación.

Se registrará el espectro de absorción de cada muestra del analito adicionada al biosensor. La respuesta del biosensor sigue monitorizando la modificación o desaparición de la banda de absorción característica de las AuNPs a 520 nm aproximadamente. La aparición de una banda sobre los 650-700 nm simultáneamente con la desaparición de la banda en 520 nm es característica de la agregación de las AuNPs en presencia de Hg^{2+} . Para cada muestra se registra el espectro de absorción según un intervalo de tiempo de 5 min hasta que el cambio en el par de bandas 520/650-700 nm sea constante. De este experimento se pueden determinar parámetros como el límite de detección del biosensor, rango dinámico lineal y sensibilidad. Para estudiar la selectividad del biosensor se propone repetir el experimento en presencia de concentraciones iguales de analito y potenciales interferentes (Ni^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Pb^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} y Ca^{2+}). Tanto este experimento como los anteriores deben realizarse por triplicado para analizar qué tan constante, y certero es el biosensor (repetibilidad y reproducibilidad).

Se propone repetir el ensayo tanto en muestras de agua potable, de ríos, lagos, así como realizarse el ensayo para fluido sanguíneo. En este caso se deberá repetir la preparación de muestras; pero en sangre la detección no podrá ser por cambio de coloración a simple vista, por lo que se necesitará de equipamiento (espectrofotómetro) para censar el desplazamiento de la banda de resonancia plasmónica. Una variante puede ser la realización de diluciones de la muestra o emplear suero. En este caso, se pueden eliminar potenciales interferencias para el ensayo, además de que sería válida la detección por cambio de coloración sin necesidad de equipamiento.

De funcionar este procedimiento se tendría un biosensor que eliminaría el problema de interferencias del fluido sanguíneo y la existencia en él de nucleasas que complican el empleo de biosensores basados en aptámeros.

Por último, basándose en experiencias analizadas en este trabajo, se propone ejecutar un ensayo para estudiar hasta qué punto el biosensor es capaz de discriminar entre distintas especies de Hg. En este caso se tendría en una misma muestra Hg^{2+} y MeHg. Se registraría el espectro UV-visible de las AuNPs en presencia de MeHg y Hg^{2+} por separado. Posteriormente, se registraría el mismo espectro pero con ambos compuestos simultáneamente. Para ello, se emplearía junto al biosensor un agente quelatante con alta afinidad por el Hg^{2+} , quien en este caso sería un interferente. Así el biosensor solo reaccionaría a la presencia de MeHg. Si el espectro registrado coincide con el obtenido inicialmente para las AuNPs en presencia solo de MeHg, entonces se podría sugerir que el biosensor auxiliado por un agente quelatante permitiría tanto la selectividad frente al Hg como la especiación del mismo.

Conclusiones

En conformidad con los objetivos del presente trabajo, se ha ejecutado una revisión bibliográfica sobre los biosensores actuales confeccionados para la detección de mercurio. Del mismo se han derivado las siguientes conclusiones:

- Se ha desarrollado un breve resumen de las características generales de los biosensores. Se ha definido qué es un biosensor, cuáles son sus principales sistemas de transducción y qué bioreceptores se emplean con mayor frecuencia. En este punto, además, se ha enfatizado en bioreceptores con grupos funcionales tiol o basados en aminoácidos contenedores de azufre, por su potencialidad para la detección de Hg.

- Se han resumido las características de los principales biosensores ópticos y electroquímicos. Para estos biosensores, concretamente, se ha analizado el empleo de bioreceptores basados en cisteína y sus análogos. Además, se trataron ejemplos donde el transductor se fundamenta en nanopartículas de oro.

- Los ejemplos de biosensores electroquímicos y ópticos encontrados se agruparon para realizar una comparación de sus potencialidades. De aquí se puede concluir que la gran mayoría se diseña para la determinación de Hg, específicamente para Hg^{2+} . La detección se realiza en muestras de agua, aplicándose en mucha menor medida (o no aplicándose en absoluto) en otros tipos de muestras, como son los fluidos biológicos.

- Los biosensores electroquímicos estudiados, en su mayoría, son capaces de detectar límites de Hg inferiores a los previstos por la OMS. Por otro lado, en los biosensores ópticos no todos son capaces de ello. No obstante la depuración en su sensibilidad permite combinar bajos límites de detección con portabilidad, ensayos rápidos y simplicidad. Esto los vuelve una opción práctica a tener en cuenta.

- Se ha conformado una propuesta plausible de confección de un biosensor óptico-colorimétrico para la detección de Hg, en muestras tanto de agua como de fluidos biológicos. En este biosensor se aspira a concentrar las experiencias de los dispositivos referenciados en este trabajo. El mismo se basa en nanopartículas de oro recubiertas con DMSA y L-cisteína. Para su construcción, se han detallado las pautas a seguir, desde su síntesis y forma de purificación, hasta su caracterización y aplicación al análisis.

Finalmente y con perspectiva futura, se aspira a considerar la propuesta de biosensor que se presenta y llevarla a la práctica. Se pretende que su ejecución analítica para la detección de Hg permita facilitar la detección de potenciales amenazas derivadas por desconocimiento de los niveles de contaminación de este metal pesado en nuestro ecosistema.

Bibliografía

1. (WHO)World Health Organization. Mercury and health. Accessed July 15, 2020. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/mercury-and-health>
2. (WHO)World Health Organization. OMS | Enfoque Estratégico para la Gestión de Productos Químicos a Nivel Internacional. Accessed July 15, 2020. <https://www.who.int/ipcs/saicm/saicm/es/>
3. ONU. Convenio de minamata sobre el mercurio. Texto y anexos. Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente. Published online 2017.
4. Substance Priority List | ATSRD. Accessed July 15, 2020. <https://www.atsdr.cdc.gov/spl/>
5. Nicholson J. How Is Mercury Used to Purify Gold? Accessed July 15, 2020. <https://sciencing.com/how-mercury-used-purify-gold-4914156.html>
6. Plenge FO, Urbina JAG, Luque JLF. Mercurio y salud en Madre de Dios, Perú. *Acta Médica Peru*. 2010;27(4):310-314.
7. Cinabrio. Accessed July 15, 2020. <https://www.mineralesweb.es/sulfuros/cinabrio.htm>
8. Millan R, Schmid T, Sierra MJ, Carrasco-Gil S, Villadóniga M, Rico C, Ledesma DMS, Puente FJD. Spatial variation of biological and pedological properties in an area affected by a metallurgical mercury plant: Almadenejos (Spain). *Appl Geochemistry*. 2011;26(2):174-181.
9. Obrist D, Kirk JL, Zhang L, Sunderland EM, Jiskra M, Selin NE. A review of global environmental mercury processes in response to human and natural perturbations : Changes of emissions , climate , and land use. *Ambio*. 2018;47(2):116-140.
10. Cycling. Accessed May 5, 2020. https://people.uwec.edu/piercech/Hg/mercury_water/cycling.htm
11. Driscoll CT, Mason RP, Chan HM, Jacob DJ, Pirrone N. Mercury as a Global Pollutant: Sources, Pathways, and Effects. *Enviromental Sci Technol*. 2013;47(40):4967-4983.
12. Martinez-Finley EJ, Aschner M. Recent Advances in Mercury Research. *Curr Environ Heal reports*. 2014;1(2):163-171.
13. Genchi G, Sinicropi MS, Carocci A, Lauria G, Catalano A. Mercury exposure and heart diseases. *Int J Environ Res Public Health*. 2017;14(1):1-13.
14. ATSDR. Evaluando la exposición al mercurio : Información para Profesionales de la Salud. Published 2012. Accessed July 15, 2020. https://www.atsdr.cdc.gov/mercury/docs/11-229617-A_Mercury_Span-508_Profesionales_de_la_Salud.pdf
15. Prevention C for DC and. Mercury Factsheet | National Biomonitoring Program | CDC. Accessed July 15, 2020. https://www.cdc.gov/biomonitoring/Mercury_FactSheet.html
16. Jansson T. Reviews of Placental Amino Acid Transport and Metabolism Amino Acid Transporters in the Human Placenta. *Pediatr Res*. 2001;49(2):141-147.

17. Compeau GC, Bartha R. Sulfate-reducing bacteria: Principal methylators of mercury in anoxic estuarine sediment. *Appl Environ Microbiol.* 1985;50(2):498-502.
18. López Guaimacuto P, Fuentes JL. Las bacterias sulfato-reductoras. *Geominas.* 2015;43(67):93.
19. Evers D. The effects of methylmercury on wildlife: A comprehensive review and approach for interpretation. *Encycl Anthr.* 2017;1-5:181-194.
20. Driscoll CT, Han Y-J, Chen CY, Evers DC, Lambert KF, Holsen TM, Kamman NC, Munson RK. Mercury Contamination in Forest and Freshwater Ecosystems in the Northeastern United States. *Bioscience.* 2007;57(1):17-28.
21. Kehrig HA, Baptista G, Di Benedetto APM, Almeida MG, Rezende CE, Siciliano S, De Moura JF, Moreira I. Biomagnificación de mercurio en la cadena trófica del Delfín Moteado del Atlántico (*Stenella frontalis*), usando el isótopo estable de nitrógeno como marcador ecológico. *Rev Biol Mar Oceanogr.* 2017;52(2):233-244.
22. Yin Z, Jiang H, Syversen T, Rocha JBT, Farina M, Aschner M. The methylmercury-L-cysteine conjugate is a substrate for the L-type large neutral amino acid transporter. *J Neurochem.* 2008;107(4):1083-1090.
23. Farina M, Rocha JBT, Aschner M. Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity: Evidence from experimental studies. *Life Sci.* 2011;89(15-16):555-563.
24. Clarkson TW, Vyas JB, Ballatori N. Mechanisms of mercury disposition in the body. *Am J Ind Med.* 2007;50(10):757-764.
25. Megan Culbreth and Michael Aschner. Dysregulation of Glutamate Cycling Mediates Methylmercury-Induced Neurotoxicity. *Glutamate/GABA-Glutamine Cycle Springer Int Publ Switzerland Adv Neurobiol* 13,. 2016;13.
26. Ashrafi AM, Koudelkova Z, Sedlackova E, Richtera L, Adam V. Review—Electrochemical Sensors and Biosensors for Determination of Mercury Ions. *J Electrochem Soc.* 2018;165(16):B824-B834.
27. Suvarapu LN, Baek SO. Recent Studies on the Speciation and Determination of Mercury in Different Environmental Matrices Using Various Analytical Techniques. *Int J Anal Chem.* 2017;2017.
28. Wasylishen RE, Lenkinski RE, Rodger C. Mercury-199 nuclear magnetic resonance relaxation in some mercury(II) compounds. *Can J Chem.* 1982;60(16):2113-2117.
29. Chen L, Li J, Chen L. Colorimetric detection of mercury species based on functionalized gold nanoparticles. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2014;6(18):15897-15904.
30. Carpenter AC, Paulsen IT, Williams TC. Blueprints for biosensors: Design, limitations, and applications. *Genes (Basel).* 2018;9(8).
31. Farka Z, Juřík T, Kovář D, Trnková L, Skládal P. Nanoparticle-Based Immunochemical Biosensors and Assays: Recent Advances and Challenges. *Chem Rev.* 2017;117(15):9973-10042.

32. Ma XM, Sun M, Lin Y, Liu YJ, Luo F, Guo LH, Qiu B, Lin ZY, Chen GN. Progress of Visual Biosensor Based on Gold Nanoparticles. *Chinese J Anal Chem.* 2018;46(1):1-10.
33. Chang C, Chen C, Wu T, Yang C, Lin C, Chen C. Gold Nanoparticle-Based Colorimetric Strategies for Chemical and Biological Sensing Applications. Published online 2019:1-24.
34. Daruich De Souza C, Ribeiro Nogueira B, Rostelato MECM. Review of the methodologies used in the synthesis gold nanoparticles by chemical reduction. *J Alloys Compd.* 2019;798:714-740.
35. J. Turkevich, P.C. Stevenson, J. Hillier. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold, *Discussions of the Faraday Society* 11 (1951) 55–75.
36. Sengani M, Grumezescu AM, Rajeswari VD. Recent trends and methodologies in gold nanoparticle synthesis – A prospective review on drug delivery aspect. *OpenNano.* 2017;2:37-46.
37. Franco-Romano M, Gil MLA, Palacios-Santander JM, Delgado-Jaén JJ, Naranjo-Rodríguez I, Hidalgo-Hidalgo De Cisneros JL, Cubillana-Aguilera LM. Sonosynthesis of gold nanoparticles from a geranium leaf extract. *Ultrason Sonochem.* 2014;21(4):1570-1577.
38. Cubillana-Aguilera LM, Franco-Romano M, Gil MLA, Naranjo-Rodríguez I, Hidalgo-Hidalgo De Cisneros JL, Palacios-Santander JM. New, fast and green procedure for the synthesis of gold nanoparticles based on sonocatalysis. *Ultrason Sonochem.* 2011;18(3):789-794.
39. Frens G. Particle size and sol stability in metal colloids. *Colloid Polym Sci.* 1972;250:736-741.
40. Aldewachi H, Chalati T, Woodroffe MN, Bricklebank N, Sharrack B, Gardiner P. Gold nanoparticle-based colorimetric biosensors. *Nanoscale.* 2018;10(1):18-33.
41. Lee JH, Cho HY, Choi HK, Lee JY, Choi JW. Application of gold nanoparticle to plasmonic biosensors. *Int J Mol Sci.* 2018;19(7).
42. Azzazy HME, Mansour MMH, Samir TM, Franco R. Gold nanoparticles in the clinical laboratory: Principles of preparation and applications. *Clin Chem Lab Med.* 2012;50(2):193-209.
43. Grieshaber D, MacKenzie R, Vörös J, Reimhult E. Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. *Sensors (Switzerland).* 2008;(23 January).
44. Rumayor González V, García Iglesias E, Ruiz Galán O, Gago Cabezas L. Aplicaciones de biosensores en la industria agroalimentaria. *CEIM, Dirección Gen Universidades e Investig.* 2005;(Madrmasd):119. <http://www.madrid.org/bvirtual/BVCM001695.pdf>
45. Malhotra BD, Ali MA. Plasmonic Nanostructures. *Nanomater Biosens.* Published online 2018:161-181.
46. Jiménez CC, León DEP. Biosensors: Implementation and outlook in the control and process quality and foodstuffs. *Vitae.* 2009;16(1):144-154.
47. Pohanka M. Overview of piezoelectric biosensors, immunosensors and DNA sensors and their applications. *Materials (Basel).* 2018;11(3).

48. Ramanathan K, Danielsson B. Principles and applications of thermal biosensors. *Biosens Bioelectron.* 2001;16(6):417-423.
49. Qie Z, Ning B, Liu M, Bai J, Peng Y, Song N. Fast detection of atrazine in corn using thermometric biosensors. Published online 2013:5151-5156.
50. Real Academia Nacional De Farmacia Biosensores Y Biochips : Published online 2006.
51. Chey CO, Ibupoto ZH, Khun K, Nur O, Willander M. Indirect determination of mercury ion by inhibition of a glucose biosensor based on ZnO nanorods. *Sensors (Switzerland)*. 2012;12(11):15063-15077.
52. Verma N, Singh M. Biosensors for heavy metals. *BioMetals*. 2005;18(2):121-129.
53. Attar A, Cubillana-Aguilera L, Naranjo-Rodríguez I, de Cisneros JLHH, Palacios-Santander JM, Amine A. Amperometric inhibition biosensors based on horseradish peroxidase and gold sononanoparticles immobilized onto different electrodes for cyanide measurements. *Bioelectrochemistry*. 2015;101:84-91.
54. Yang, Y.; Wang, Z.; Yang, M.; Guo, M.; Wu, Z.; Shen, G.; Yu R. Inhibitive determination of mercury ion using a renewable urea biosensor based on self-assembled gold nanoparticles. *Sens Actuators B Chem* 2006, 114, 1–8.
55. Guascito, M.R.; Malitesta, C.; Mazzotta, E.; Turco A. Inhibitive determination of metal ions by an amperometric glucose oxidase biosensor: Study of the effect of hydrogen peroxide decomposition. *Sens Actuators B Chem*. 131, 394–4.
56. Samphao A, Rerkchai H, Jitcharoen J, Nacapricha D, Kalcher K. Indirect determination of mercury by inhibition of glucose oxidase immobilized on a carbon paste electrode. *Int J Electrochem Sci*. 2012;7(2):1001-1010.
57. Ashrafi AM, Sýs M, Sedláčková E, Farag AS, Adam V, Přibyl J, Richtera L. Application of the enzymatic electrochemical biosensors for monitoring non-competitive inhibition of enzyme activity by heavy metals. *Sensors (Switzerland)*. 2019;19(13).
58. López MA, Ortega F, Domínguez E, Katakis I. Electrochemical immunosensor for the detection of atrazine. *J Mol Recognit*. 1998;11(1-6):178-181.
59. Brosnan J, Brosnan M. 5th Amino Acid Assessment Workshop. The Sulfur-Containing Amino Acids: An Overview. *J Nutr*. 2006;136(6):16365-16405.
60. Liu Q, Wei W, Cai L, Cherian MG. Metallothionein and Intracellular Sequestration of Metals. *Compr Toxicol Third Ed*. 2018;10-15(Piscator 1964):557-573.
61. Krajewska B. Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review. *J Mol Catal B Enzym*. 2009;59(1-3):9-21.
62. Lin Y, Peng Y, Di J. Electrochemical detection of Hg(II) ions based on nanoporous gold nanoparticles modified indium tin oxide electrode. *Sensors Actuators, B Chem*. 2015;220:1086-1090.
63. Xie Y. Colorimetric determination of Hg(II) via the gold amalgam induced deaggregation of

- gold nanoparticles. *Microchim Acta*. 2018;185(7):1-6.
64. Tu J, Gan Y, Liang T, Hu Q, Wang Q, Ren T, Sun Q, Wan H, Wang P. Graphene FET array biosensor based on ssDNA aptamer for ultrasensitive Hg²⁺ detection in environmental pollutants. *Front Chem*. 2018;6(AUG).
 65. Wang Z, Yang M, Chen C, Zhang L, Zeng H. Selectable Ultrasensitive Detection of Hg²⁺ with Rhodamine 6G-Modified Nanoporous Gold Optical Sensor. *Sci Rep*. 2016;6:1-7.
 66. Fu C, Yu H, Su L, Liu C, Song Y, Wang S, Lin Z, Chen F. A homogeneous electrochemical sensor for Hg(II) determination in environmental water based on the T-Hg(II)-T structure and exonuclease III-assisted recycling amplification. *Analyst*. 2018;143(9):2122-2127.
 67. Nanda Kumar D, Chandrasekaran N, Mukherjee A. Horseradish peroxidase-mediated in situ synthesis of silver nanoparticles: application for sensing of mercury. *New J Chem*. 2018;42(16):13763-13769.
 68. Gumpu MB, Krishnan UM, Rayappan JBB. Design and development of amperometric biosensor for the detection of lead and mercury ions in water matrix—a permeability approach. *Anal Bioanal Chem*. 2017;409(17):4257-4266.
 69. Solanki PR, Kaushik A, Agrawal V V., Malhotra BD. Nanostructured metal oxide-based biosensors. *NPG Asia Mater*. 2011;3(1):17-24.
 70. Vanitha M, Balasubramanian N, Joni IM, Panatarani C. Detection of mercury ions using L-cysteine modified electrodes by anodic stripping voltammetric method. *AIP Conf Proc*. 2018;1927(February).
 71. Redrovan-pesantez FF, Pesantez FF. Aplicación de voltamperometría de redisolución anódica para la determinación de antimonio. *Rev Soc Química Perú*. 2019;85(3).
 72. Xu M, Yang L, Wang Q. Chemical interactions of mercury species and some transition and noble metals towards metallothionein (Zn7MT-2) evaluated using SEC/ICP-MS, RP-HPLC/ESI-MS and MALDI-TOF-MS. *Metallomics*. 2013;5(7):855-860.
 73. Irvine GW, Tan SN, Stillman MJ. A simple metallothionein-based biosensor for enhanced detection of arsenic and mercury. *Biosensors*. 2017;7(1):1-11.
 74. Ju H, Leech D. Electrochemical study of a metallothionein modified gold disk electrode and its action on Hg (II) cations. *J Electroanal Chem*. 2000;484(2):150-156.
 75. Yuan Liu, Yan Deng, Taotao Li, Zhu Chen, Hui Chen, Song Li and HL. Aptamer-Based Electrochemical Biosensor for Glass Carbon Electrode. *J Biomed Nanotechnol*. 2018;14(12):2156–2161.
 76. Jayadevimanoranjitham J, Narayanan SS. 2,4,6-Trimercaptotriazine incorporated gold nanoparticle modified electrode for anodic stripping voltammetric determination of Hg(II). *Appl Surf Sci*. 2018;448(Ii):444-454.
 77. Laffont L, Hezard T, Gros P, Heimbürger LE, Sonke JE, Behra P, Evrard D. Mercury(II) trace detection by a gold nanoparticle-modified glassy carbon electrode using square-wave anodic

- stripping voltammetry including a chloride desorption step. *Talanta*. 2015;141(Ii):26-32.
78. Zhou G, Chang J, Pu H, Shi K, Mao S, Sui X, Ren R, Cui S, Chen J. Ultrasensitive Mercury Ion Detection Using DNA-Functionalized Molybdenum Disulfide Nanosheet/Gold Nanoparticle Hybrid Field-Effect Transistor Device. *ACS Sensors*. 2016;1(3):295-302.
 79. Suherman AL, Tanner EEL, Compton RG. Recent developments in inorganic Hg (II) detection by voltammetry. *TrAC - Trends Anal Chem*. 2017;94:161-172.
 80. Shen J, Zhou T, Huang R. Recent Advances in Electrochemiluminescence Sensors for Pathogenic Bacteria Detection. Published online 2019.
 81. Zhao Z, Zhou X. Ultrasensitive electrochemiluminescence detection of mercury ions based on DNA oligonucleotides and cysteamine modified gold nanoparticles probes. *Sensors Actuators, B Chem*. 2012;171-172:860-865.
 82. Domínguez-Renedo O, Alonso-Lomillo MA, Ferreira-Gonçalves L, Arcos-Martínez MJ. Development of urease based amperometric biosensors for the inhibitive determination of Hg (II). *Talanta*. 2009;79(5):1306-1310.
 83. Xiong E, Wu L, Zhou J, Yu P, Zhang X, Chen J. A ratiometric electrochemical biosensor for sensitive detection of Hg (II) based on thymine-Hg (II)-thymine structure. *Anal Chim Acta*. 2015;853(1):242-248.
 84. Zhang Z, Tang A, Liao S, Chen P, Wu Z, Shen G, Yu R. Oligonucleotide probes applied for sensitive enzyme-amplified electrochemical assay of mercury(II) ions. *Biosens Bioelectron*. 2011;26(7):3320-3324.
 85. Niu X, Ding Y, Chen C, Zhao H, Lan M. A novel electrochemical biosensor for Hg (II) determination based on Hg (II)-induced DNA hybridization. *Sensors Actuators, B Chem*. 2011;158(1):383-387.
 86. Siddiqui S, Nafady A, El-Sagher HM, Al-Saeedi SI, Alsalmeh AM, Sirajuddin, Talpur FN, Sherazi STH, Kalhor MS, Shah MR, Shaikh T, Arain M, Bhargava SK. Sub-ppt level voltammetric sensor for Hg²⁺ detection based on nafion stabilized l-cysteine-capped Au@Ag core-shell nanoparticles. *J Solid State Electrochem*. 2019;23(7):2073-2083.
 87. Ferdaous Maâtouk, Mouna Maâtouk, Karima Bekir, Houcine Barhoumi AM and HBM. An electrochemical DNA biosensor for trace amounts of mercury ion quantification. *J water Helath*. 2016;14(5):808-815.
 88. Zhang Y, Xie J, Liu Y, Pang P, Feng L, Wang H, Wu Z, Yang W. Simple and signal-off electrochemical biosensor for mercury(II) based on thymine-mercury (II)-thymine hybridization directly on graphene. *Electrochim Acta*. 2015;170:210-217.
 89. Tu J, Gan Y, Liang T, Hu Q, Wang Q, Ren T, Sun Q, Wan H, Wang P. Graphene FET Array Biosensor Based on ssDNA Aptamer for Ultrasensitive Hg(II) Detection in Environmental Pollutants. *Front Chem*. 2018;6:333.
 90. Aizawa M, Tanaka M, Ikariyama Y, Shinohara H. Luminescence biosensors. *J Biolumin*

- Chemilumin.* 1989;4(1):535-542.
91. Huang C-C, Chang H-T. Selective gold-nanoparticle-based “turn-on” fluorescent sensors for detection of mercury(II) in aqueous solution. *Anal Chem.* 2006;78(24):8332—8338.
 92. Lin YW, Huang CC, Chang HT. Gold nanoparticle probes for the detection of mercury, lead and copper ions. *Analyst.* 2011;136(5):863-871.
 93. Chai F, Wang C, Wang T, Ma Z, Su Z. L-cysteine functionalized gold nanoparticles for the colorimetric detection of Hg (II) induced by ultraviolet light. *Nanotechnology.* 2010;21(2).
 94. Xu D, Yu S, Yin Y, Wang S, Lin Q, Yuan Z. Sensitive colorimetric Hg (II) detection via amalgamation-mediated shape transition of gold nanostars. *Front Chem.* 2018;6(NOV):1-9.
 95. Martínez-Hernández ME, Goicoechea J, Arregui FJ. Hg (II) optical fiber sensor based on LSPR generated by gold nanoparticles embedded in LBL nano-assembled coatings. *Sensors (Switzerland).* 2019;19(22).
 96. Xiong C, Ling L. Localized surface plasmon resonance light-scattering sensor for Mercury(II) ion with label-free gold nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol.* 2013;13(2):1406-1410.
 97. Sardar R, Funston AM, Mulvaney P, Murray RW. Gold nanoparticles: Past, present, and future. *Langmuir.* 2009;25(24):13840-13851.
 98. Jain PK, El-Sayed MA. Plasmonic coupling in noble metal nanostructures. *Chem Phys Lett.* 2010;487(4-6):153-164.
 99. Liu G, Lu M, Huang X, Li T, Xu D. Application of Gold-Nanoparticle Colorimetric Sensing to Rapid Food Safety Screening. Published online 2018:1-16.
 100. Yu L, Li N. Noble Metal Nanoparticles-Based Colorimetric Biosensor for Visual Quantification : A Mini Review. Published online 2019.
 101. Sato K, Hosokawa K, Maeda M. Rapid Aggregation of Gold Nanoparticles Induced by Non-Cross-Linking DNA Hybridization. Published online 2003:8102-8103.
 102. Akiyama Y, Wang G, Shiraishi S, Kanayama N, Takarada T, Maeda M. Rapid Naked-Eye Discrimination of Cytochrome P450 Genetic Polymorphism through Non-Crosslinking Aggregation of DNA-Functionalized Gold Nanoparticles. *ChemistryOpen.* 2016;5(6):508-512.
 103. Kanayama, N., Takarada, T., & Maeda, M. (2011). R. Chemical Communications, 47(7) 2077-2079. Rapid naked-eye detection of mercury ions based on non-crosslinking aggregation of double-stranded DNA-carrying gold nanoparticles. (7):2077-2079.
 104. Long YJ, Li YF, Liu Y, Zheng JJ, Tang J, Huang CZ. Visual observation of the mercury-stimulated peroxidase mimetic activity of gold nanoparticles. *Chem Commun.* 2011;47(43):11939-11941.
 105. Zhao Y, Gui L, Chen Z. Colorimetric detection of Hg (II) based on target-mediated growth of gold nanoparticles. *Sensors Actuators, B Chem.* 2017;241:262-267.
 106. Xie ZJ, Bao XY, Peng CF. Highly sensitive and selective colorimetric detection of methylmercury based on DNA functionalized gold nanoparticles. *Sensors (Switzerland).*

- 2018;18(8).
107. Ding N, Zhao H, Peng W, He Y, Zhou Y, Yuan L, Zhang Y. A simple colorimetric sensor based on anti-aggregation of gold nanoparticles for Hg (II) detection. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp.* 2012;395:161-167.
 108. Liu D, Qu W, Chen W, Zhang W, Wang Z, Jiang X. Highly sensitive, colorimetric detection of mercury(II) in aqueous media by quaternary ammonium group-capped gold nanoparticles at room temperature. *Anal Chem.* 2010;82(23):9606-9610.
 109. Ma X, Wang Z, He S, Zhao J, Lai X, Xu J. L-Cysteine modified gold nanoparticles for tube-based fluorometric determination of mercury (II) ions. Published online 2019.
 110. Lai C, Qin L, Zeng G, Liu Y, Huang D, Zhang C, Xu P, Cheng M, Wang M. Sensitive and selective detection of mercury ions based on papain and 2,6-pyridinedicarboxylic acid functionalized gold nanoparticles. *RSC Adv.* 2016;6:3259-3266.
 111. Li YL, Leng YM, Zhang YJ, Li TH, Shen ZY, Wu AG. A new simple and reliable Hg (II) detection system based on anti-aggregation of unmodified gold nanoparticles in the presence of O-phenylenediamine. *Sensors Actuators, B Chem.* 2014;200:140-146.
 112. Chaudhary A, Dwivedi C, Chawla M, Gupta A, Nandi CK. Lysine and dithiothreitol promoted ultrasensitive optical and colorimetric detection of mercury using anisotropic gold nanoparticles. *J Mater Chem C.* 2015;3(27):6962-6965.
 113. Huang C, Chang H. Selective Gold-Nanoparticles-Based “Turn-On” Fluorescent Sensors for Detection of Mercury (II) in Aqueous Solution. *Anal Chem.* 2006;78(24):8332-8338.
 114. Xing Y, Zhu Q, Zhou X, Qi P. A gold nanoparticle-based colorimetric mercury(II) biosensor using a DNA probe with phosphorothioate RNA modification and exonuclease III-assisted signal amplification. *Microchim Acta.* 2020;187(4).
 115. Liu S, Leng X, Wang X, Pei Q, Cui X, Wang Y, Huang J. Enzyme-free colorimetric assay for mercury(II) using DNA conjugated to gold nanoparticles and strand displacement amplification. *Microchim Acta.* 2017;184(7):1969-1976.
 116. Chung CH, Kim JH, Jung J, Chung BH. Nuclease-resistant DNA aptamer on gold nanoparticles for the simultaneous detection of Pb (II) and Hg (II) in human serum. *Biosens Bioelectron.* 2013;41(1):827-832.
 117. Mcfarland AD, Haynes CL, Mirkin CA, Duyne RP Van, Godwin HA, Road S. Color My Nanoworld. 2004;81(4).

ANEXOS

Anexo 1: Biosensores electroquímicos para detección de Hg basados en ADN como bioreceptor.

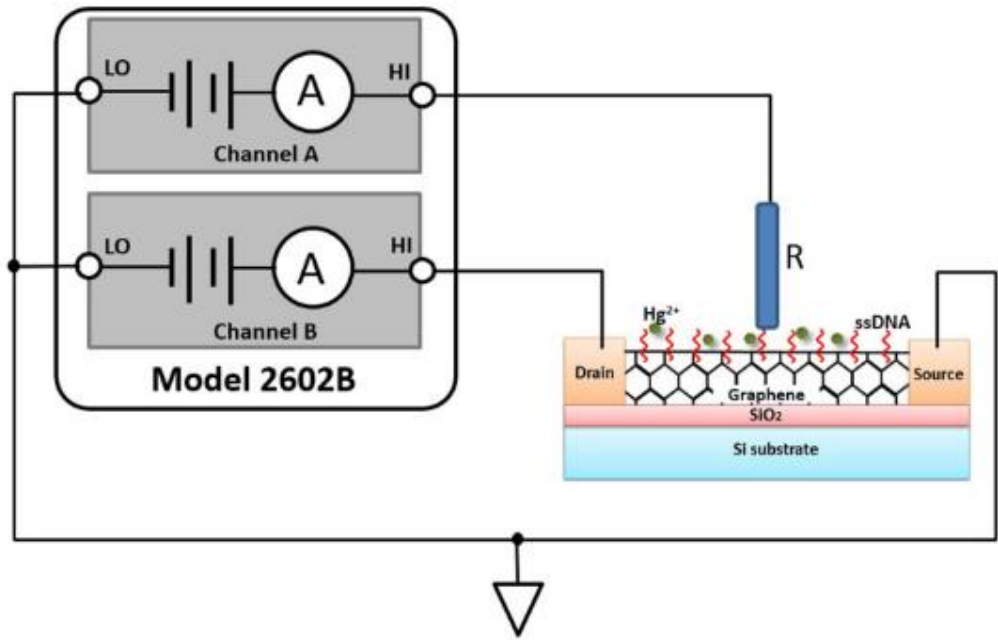


Diagrama de funcionamiento del biosensor (FET-Grafeno-ADN), según Ref⁶⁴

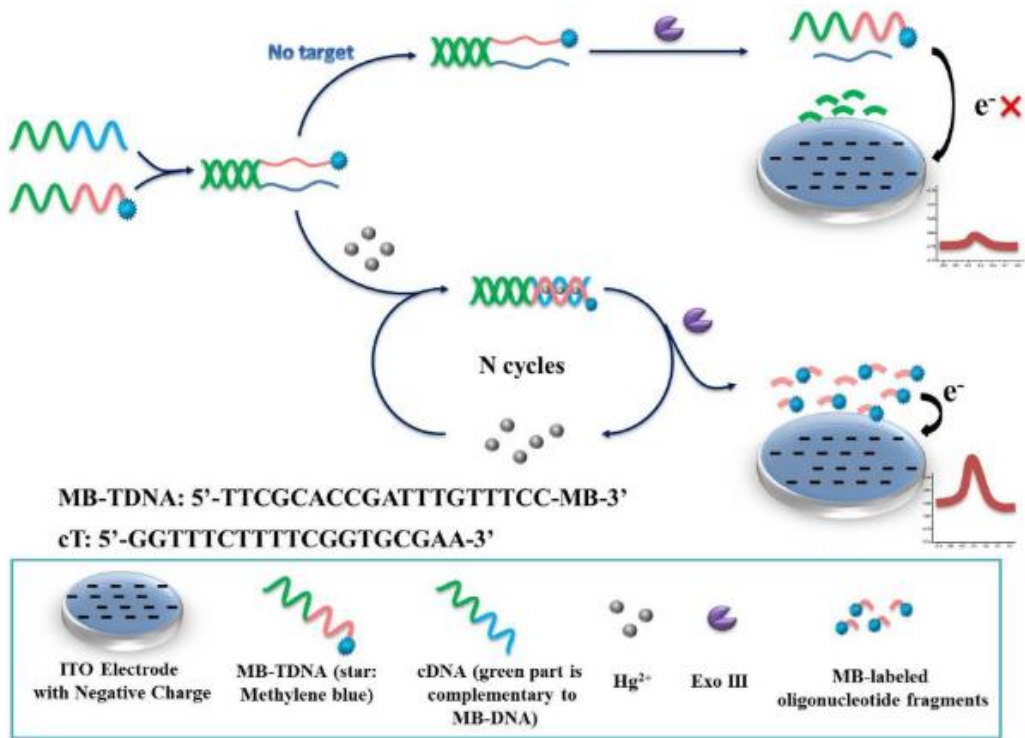


Diagrama de funcionamiento del biosensor (ITO/ADN/EXO III), según Ref⁶³.

Anexo 2: Biosensores electroquímicos para detección de Hg basados en AuNPs/Cisteína y análogos

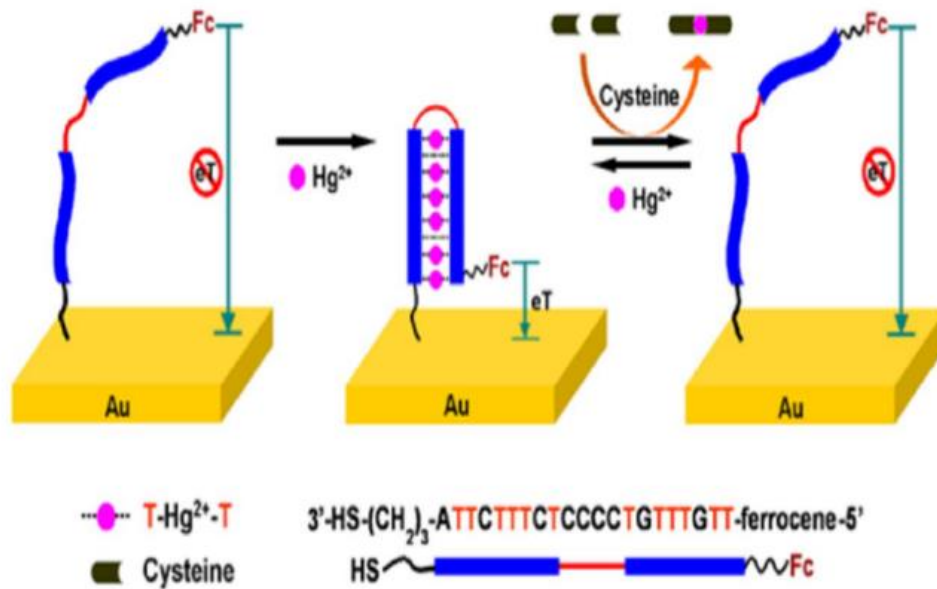


Diagrama de funcionamiento de biosensor electroquímico, según Ref²⁶

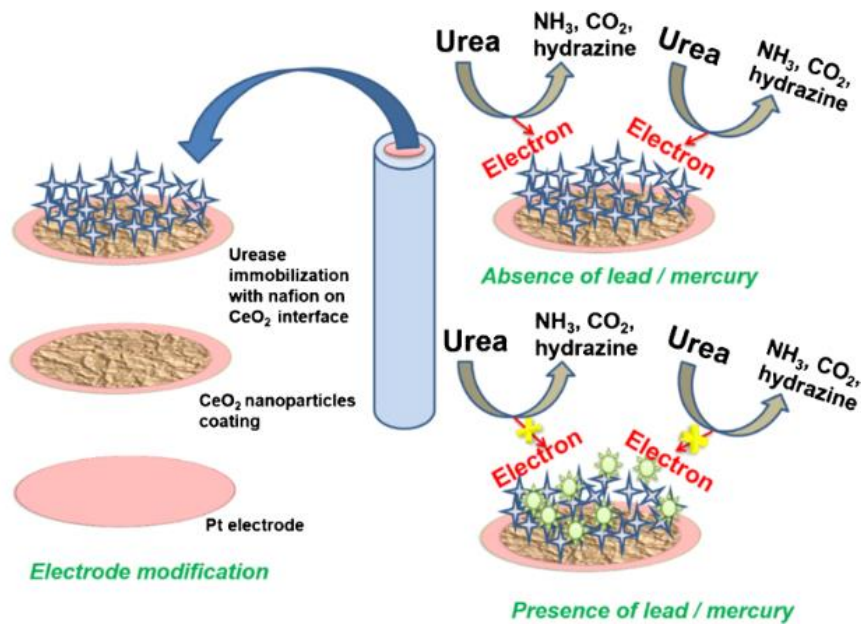


Diagrama de funcionamiento de biosensor electroquímico, según Ref⁶⁸.

Anexo 3: Biosensores ópticos-colorimétricos basados en AuNPs-cisteína y análogos para la detección de Hg.

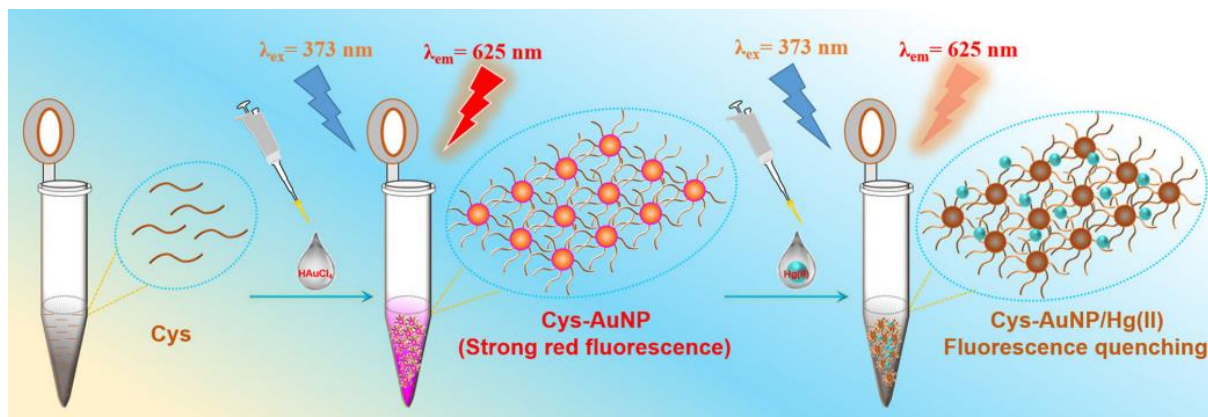


Diagrama de funcionamiento de biosensor de fluorescencia, según Ref¹⁰⁹.

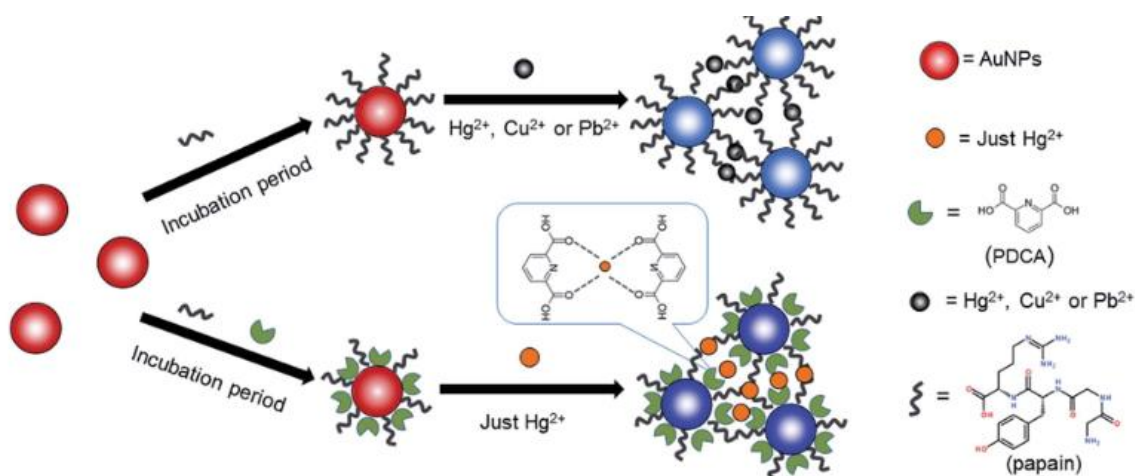


Diagrama de funcionamiento de biosensor colorimétrico de agregación, según Ref¹¹⁰.

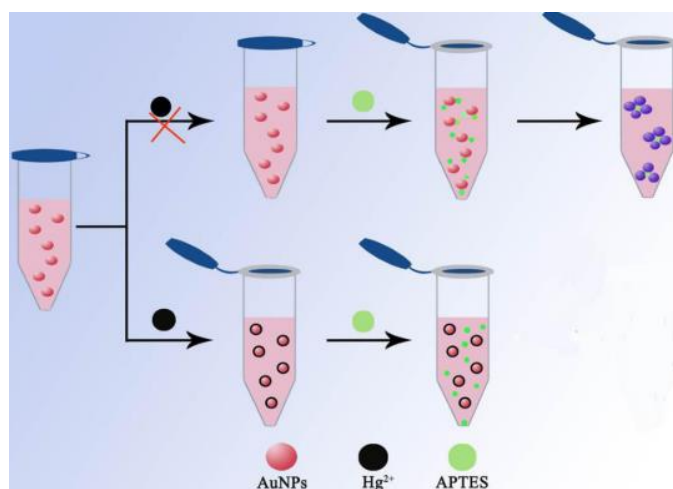
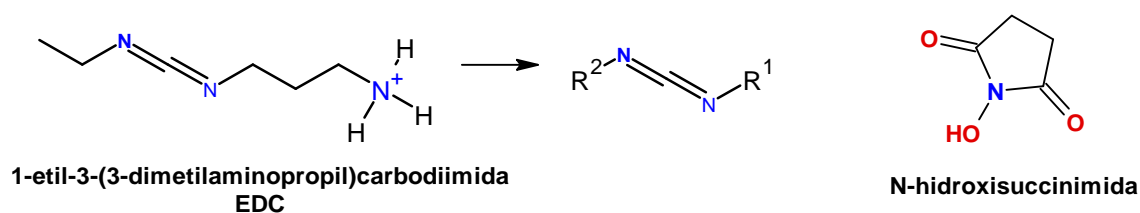
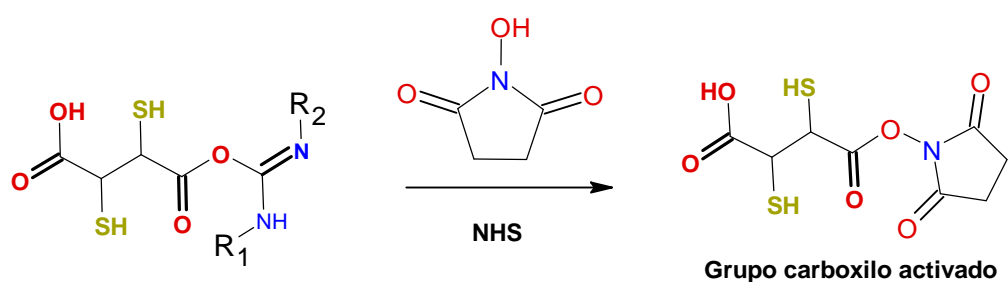
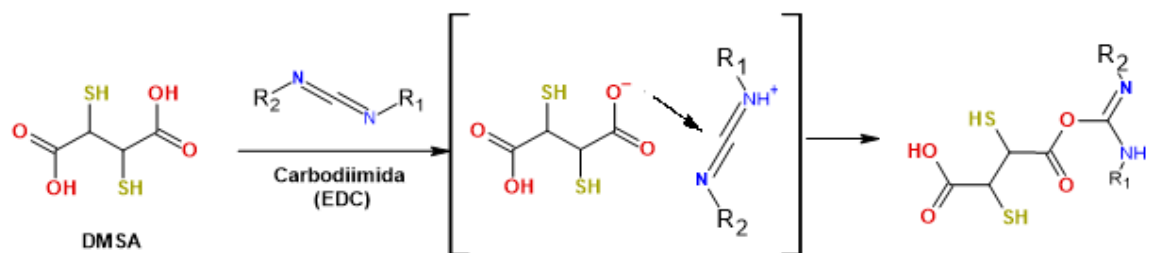
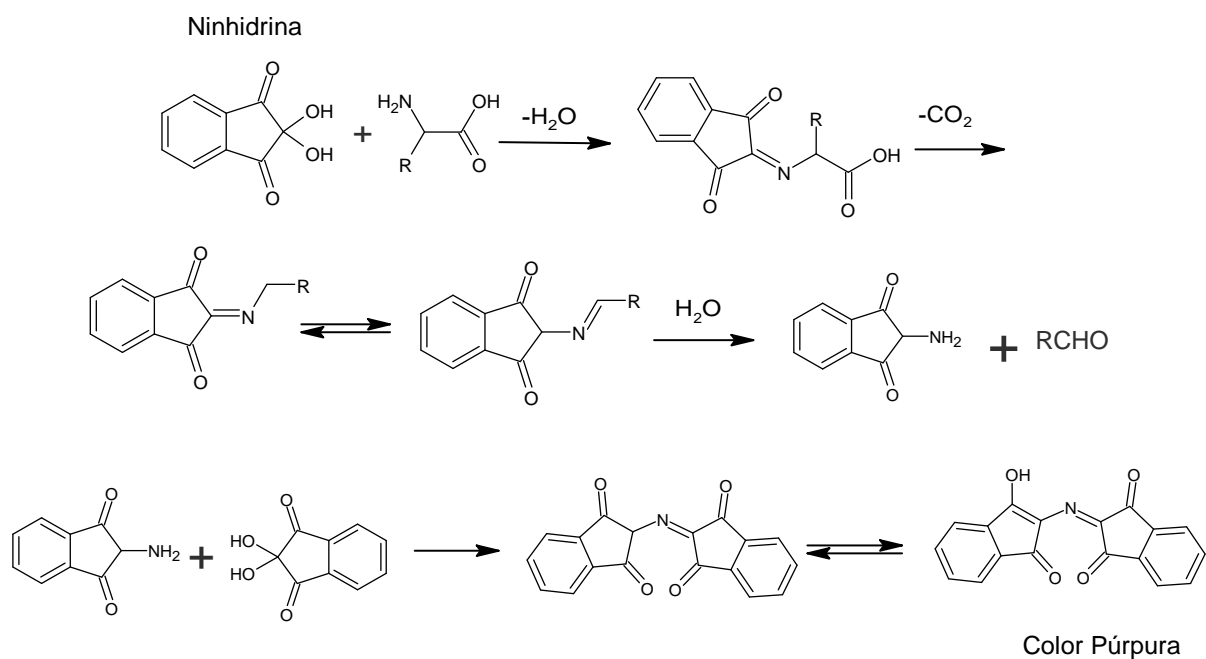


Diagrama de funcionamiento de biosensor colorimétrico de anti-agregación, según Ref⁶³.

Anexo 4: Esquema representativo de la reacción de acople con EDC/NHS de las AuNPs-L-cys con DMSA.



Anexo 5: Ensayo de la Ninhidrina.



El ensayo es positivo de existir grupos amino libres que al reaccionar con la ninhidrina forman un compuesto de coloración púrpura. De no existir grupos amino libres, la disolución mantiene su color amarillo pálido.